

Instrucciones de uso

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO
SOLO PARA EXPORTACIÓN

Uso previsto

El Instrumento NovaSeq 6000Dx está concebido para la secuenciación de bibliotecas de ADN cuando se usa con ensayos de diagnóstico *in vitro* (DIV). El Instrumento NovaSeq 6000Dx está concebido para ser utilizado con reactivos específicos registrados, certificados o aprobados para DIV y software analítico.

Principios del procedimiento

El Illumina® Instrumento NovaSeq 6000Dx está concebido para la secuenciación de bibliotecas de ADN con ensayos de diagnóstico *in vitro*. Para la entrada, el NovaSeq 6000Dx usa bibliotecas generadas a partir de ADN en las que los índices de muestra y las secuencias de captura se añaden a los objetivos amplificados. Las bibliotecas de muestras se capturan en una celda de flujo y se secuencian en el instrumento por medio de la química de secuenciación por síntesis (SBS). El proceso químico de SBS usa un método basado en terminadores reversibles para detectar bases de nucleótidos únicos marcados con un colorante fluorescente a medida que se incorporan a las cadenas de ADN en crecimiento. El software de análisis en tiempo real (RTA) realiza análisis de imágenes y llamada de bases. Asimismo, asigna una puntuación de calidad a cada base de cada ciclo de secuenciación. Cuando finaliza el análisis principal, es posible ejecutar el análisis secundario en el Servidor DRAGEN para NovaSeq 6000Dx de Illumina incluido y requerido para procesar las llamadas de bases. El NovaSeq 6000Dx utiliza aplicaciones diferentes para llevar a cabo el análisis secundario dependiendo del flujo de trabajo. Para la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, el procesamiento incluye el demultiplexado, la generación del archivo FASTQ, la alineación, la llamada de variantes y la generación de archivos en formato de llamada de variantes (VCF y gVCF). Los archivos VCF y gVCF contienen información sobre las variantes germinales o somáticas (dependiendo del flujo de trabajo seleccionado) que se encuentran en posiciones específicas en un genoma de referencia.

Modo doble de operación

El NovaSeq 6000Dx incluye un disco duro de arranque simple con modos independientes para diagnóstico *in vitro* (DIV) y para uso exclusivo en investigación (RUO). El modo se selecciona utilizando un botón de alternancia en la pantalla Sequencing (Secuenciación). El modo seleccionado se etiqueta con claridad en la interfaz en todas las pantallas. Los ensayos de secuenciación de DIV, incluida la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx en cualquiera de los flujos de trabajo germinal o somático, se ejecutan en modo DIV. Solo los reactivos de secuenciación de DIV pueden usarse en modo DIV. Las características de rendimiento y las limitaciones del procedimiento para el NovaSeq 6000Dx se han establecido utilizando la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx en modo DIV.

Limitaciones del procedimiento

1. Solo para uso diagnóstico *in vitro*.
2. La aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, cuando se utiliza con el Kit de reactivos S2 v1.5 para NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) y el Kit de reactivos S4 v1.5 para NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) es capaz de ofrecer:
 - Resultados de secuenciación:
 - $\geq 1,0$ terabases (TB) con el kit S2
 - $\geq 3,0$ TB con el kit S4
 - Longitud de lectura (en experimento "paired-end"): 2×150 pares de bases (pb).
 - Bases por encima de Q30 ≥ 85 % a una longitud de lectura de 2×150 pb. Un 85 % o más de las llamadas de bases tienen una puntuación de calidad según la escala de Phred mayor de 30, lo que indica una exactitud de la llamada de bases superior al 99,9 %.
3. Las inserciones de una longitud >18 pb y las deleciones de una longitud >21 pb no se han validado.
4. Es posible que las variantes de mayor tamaño, incluidas las variantes de nucleótidos múltiples (MNV, Multi-Nucleotide Variants) y las indels de gran tamaño, aparezcan en el archivo VCF de resultados por separado como variantes de menor tamaño.
5. Las MNV pequeñas se notifican como variantes independientes en el archivo VCF de salida.
6. Las deleciones se identifican en el archivo VCF en la coordenada de la base precedente de cada formato VCF. Por lo tanto, se deben considerar las variantes adyacentes antes de identificar una llamada de bases individual como una referencia homocigótica.
7. Limitaciones específicas de la variante germinal:
 - El NovaSeq 6000Dx, utilizando el flujo de trabajo de análisis de la generación de archivos FASTQ y VCF Germline de la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, se ha diseñado para ofrecer resultados cualitativos para la llamada de variantes germinales (p. ej., homocigótica, heterocigótica, estado natural).
 - La variación en el número de copias puede influir en la identificación de una variante como homocigótica o heterocigótica.
 - El sistema no notificará más de dos variantes en un solo locus, incluso en presencia de variación en el número de copias.
8. Limitaciones específicas de la variante somática:
 - El NovaSeq 6000Dx, utilizando el flujo de trabajo de análisis de la generación de archivos FASTQ y VCF Somatic de la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, se ha diseñado para ofrecer resultados cualitativos para la llamada de variantes somáticas (esto es, la presencia de una variante somática).

- El flujo de trabajo de análisis de la generación de archivos FASTQ y VCF Somatic no puede diferenciar las variantes germinales y somáticas. El flujo de trabajo se ha diseñado para detectar las variantes dentro de un espectro de frecuencias de variantes, pero no es posible utilizar las frecuencias para diferenciar las variantes germinales de las somáticas.
- El tejido común que se encuentre en la muestra influye en la detección de las variantes. El límite de detección se basa en una frecuencia de variante relativa al total de ADN que se ha extraído del tumor y del tejido común.
- Si más de un alelo de la variante es llamado al mismo locus, no se notificará ninguno de los alelos como variantes que superan el filtro. En su lugar, se notificará todo el conjunto de alelos, pero se filtrará mediante el marcador multialélico.

Procedimientos de control de calidad

El software NovaSeq 6000Dx evalúa cada experimento, cada muestra y cada llamada de bases de acuerdo con las métricas de control de calidad. Para la preparación de bibliotecas se recomiendan controles positivos y negativos que deben ser evaluados. Evalúe los controles como se indica a continuación.

- Control negativo sin cadena molde u otro control negativo: debe generar el resultado previsto. Si el control negativo genera un resultado distinto al previsto, significa que se ha producido un posible error en el seguimiento de la muestra, un registro incorrecto de los cebadores de índice o contaminación.
- Muestra de control positivo: debe generar el resultado previsto. Si el control positivo genera un resultado distinto al previsto, significa que se ha producido un posible error en el seguimiento de la muestra o el registro incorrecto de los cebadores de índice.

Componentes del producto

El Illumina NovaSeq 6000Dx consta de lo siguiente:

1. Instrumento NovaSeq 6000Dx (N.º de catálogo 20068232)
2. Los componentes de software para el Instrumento NovaSeq 6000Dx incluyen lo siguiente:

Aplicación de software	Ubicación de instalación	Función	Descripción
Software operativo del NovaSeq	NovaSeq 6000Dx	Controla el funcionamiento del instrumento	El Software operativo del NovaSeq (NVOS) controla el funcionamiento del instrumento durante la secuenciación y genera imágenes para que las utilice el software de análisis en tiempo real (Real-Time Analysis, RTA).

Aplicación de software	Ubicación de instalación	Función	Descripción
Software de análisis en tiempo real (RTA)	NovaSeq 6000Dx	Realiza el análisis principal	La aplicación de software de RTA convierte las imágenes que genera NVOS de cada placa por ciclo de experimento de secuenciación en archivos de llamada de bases. Los archivos de llamada de bases son entradas de los módulos de aplicación en el Servidor DRAGEN para NovaSeq 6000Dx de Illumina. La aplicación de software de RTA no tiene interfaz de usuario.
Illumina Run Manager	Servidor DRAGEN de Illumina	Controla la configuración y gestión del experimento	Illumina Run Manager proporciona gestión de usuarios y del instrumento, aloja el software de la aplicación, y habilita el uso de los módulos de análisis secundario de genómica acelerado por hardware de DRAGEN.

Condiciones de funcionamiento

Para obtener más información sobre las condiciones de funcionamiento, consulte la sección Consideraciones medioambientales de la *Documentación del producto del instrumento NovaSeq 6000Dx*.

Elemento	Especificación
Temperatura	Mantenga una temperatura de laboratorio de entre 19 °C y 25 °C (22 °C ± 3 °C). Se trata del intervalo de temperatura de funcionamiento del instrumento. Durante un experimento, no deje que la temperatura ambiente varíe más de ±2 °C.
Humedad	Mantenga una humedad relativa sin condensación de entre el 20 % y el 80 %. El sistema debe ser utilizado a una altura máxima de operación de 2000 metros.

Consumibles y equipos

Esta sección recoge todo lo necesario para realizar un experimento de secuenciación en NovaSeq 6000Dx. Esto incluye los consumibles suministrados por Illumina y los consumibles y el equipo auxiliares que debe obtener de otros proveedores. Estos artículos son necesarios para completar el protocolo y para realizar los procedimientos de mantenimiento y resolución de problemas.

Para más información sobre los símbolos que aparecen en los consumibles o en su embalaje, consulte [Leyenda de los símbolos de DIV de Illumina \(n.º de documento 1000000039141\)](#).

Consumibles de secuenciación

Un experimento NovaSeq 6000Dx requiere los siguientes componentes:

- Cartucho de tampones
- Cartucho de grupos
- Celda de flujo
- Tubo de bibliotecas
- Cartucho de SBS

Los consumibles NovaSeq 6000Dx se envasan en las siguientes configuraciones. Cada componente utiliza identificación de radiofrecuencia (RFID) para un seguimiento y una compatibilidad de los consumibles más precisos.

Tabla 1 Consumibles proporcionados por Illumina

Nombre del kit	Contenido	Número de catálogo Illumina
Kit de reactivos S2 v1.5 para NovaSeq 6000Dx (300 ciclos)	Cartucho de grupos S2 Celda de flujo S2 Cartucho de SBS S2	20046931
Kit de reactivos S4 v1.5 para NovaSeq 6000Dx (300 ciclos)	Cartucho de grupos S4 Celda de flujo S4 Cartucho de SBS S4	20046933
Cartucho de tampones S2 NovaSeq 6000Dx	Cartucho de tampones S2	20062292
Cartucho de tampones S4 NovaSeq 6000Dx	Cartucho de tampones S4	20062293
Tubo de bibliotecas NovaSeq 6000Dx	Tubo de bibliotecas individual	20062290
Tubo de bibliotecas NovaSeq 6000Dx, envase de 24	24 tubos de bibliotecas	20062291

Para garantizar un rendimiento adecuado, cuando reciba los consumibles, almacene sus componentes a la temperatura indicada.

Tabla 2 Almacenamiento del kit NovaSeq 6000Dx

Consumible	Cantidad	Temperatura de almacenamiento	Longitud	Anchura	Altura
Celda de flujo	1	Entre 2 °C y 8 °C	27,7 cm (10,9 in)	17 cm (6,7 in)	3,8 cm (1,5 in)
Cartucho de grupos	1	Entre -25 °C y -15 °C	29,5 cm (11,6 in)	13 cm (5,1 in)	9,4 cm (3,7 in)

Consumible	Cantidad	Temperatura de almacenamiento	Longitud	Anchura	Altura
Cartucho de SBS	1	Entre -25 °C y -15 °C	30 cm (11,8 in)	12,4 cm (4,9 in)	11,2 cm (4,4 in)
Cartucho de tampones	1	Entre 15 °C y 30 °C	42,2 cm (16,6 in)	20,6 cm (8,1 in)	21,1 cm (8,3 in)
Tubo de bibliotecas	1	Entre 15 °C y 30 °C	4,1 cm (1,6 in)	2,3 cm (0,9 in)	12,4 cm (4,9 in)

Detalles de los consumibles

Para identificar componentes del kit compatibles, las celdas de flujo y los cartuchos están etiquetados con símbolos que muestran el modo del kit.

Tabla 3 Etiquetado de compatibilidad

Modo del kit	Marcado de la etiqueta	Descripción
Componentes del kit S2		La celda de flujo S2 genera hasta 4100 millones de lecturas individuales que superan el filtro, con resultados de hasta 1000 Gb a 2 × 150 pb. La celda de flujo S2 proporciona secuenciación rápida para la mayoría de las aplicaciones de alta productividad.
Componentes del kit S4		La celda de flujo S4 genera hasta 10 000 millones de lecturas individuales que superan el filtro, con resultados de hasta 3000 Gb a 2 × 150 pb. La celda de flujo S4 es una versión de celda de flujo de cuatro carriles diseñada para lograr el mayor número de resultados.

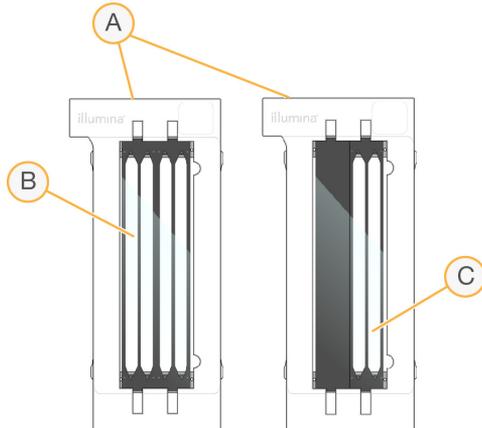
Celda de flujo

La celda de flujo de NovaSeq 6000Dx es una celda de flujo de tramas integrada en un cartucho. La celda de flujo es un sustrato basado en vidrio que contiene miles de millones de nanopocillos en una disposición ordenada. Los grupos se generan en los nanopocillos, desde los cuales se lleva a cabo posteriormente la secuenciación.

Cada celda de flujo cuenta con varios carriles para secuenciar bibliotecas agrupadas. La celda de flujo S2 tiene 2 carriles y la S4 tiene cuatro. Se adquieren imágenes de cada carril en varios sectores y, posteriormente, el software divide la imagen de cada sector en secciones de menor tamaño denominadas placas.

Es normal que la celda de flujo presente algunos arañazos u otros defectos superficiales y no es previsible que estos afecten a la calidad y cantidad de los datos. Illumina recomienda utilizar estas celdas de flujo siguiendo el procedimiento normal.

Figura 1 Celdas de flujo



- A. Cartucho de la celda de flujo
- B. Celda de flujo de 4 carriles (S4)
- C. Celda de flujo de 2 carriles (S2)

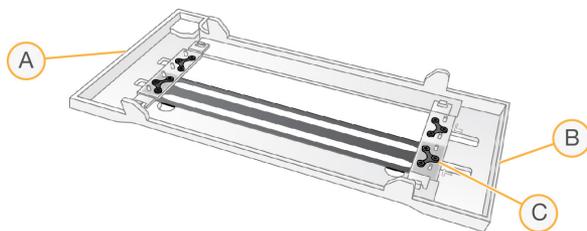
La parte inferior de las celdas de flujo cuenta con múltiples juntas. Las bibliotecas y los reactivos acceden a los carriles de la celda de flujo a través de las juntas del extremo de entrada de la celda de flujo. Los reactivos utilizados se expulsan de los carriles a través de las juntas del extremo de salida.



PRECAUCIÓN

No toque las juntas cuando manipule la celda de flujo.

Figura 2 Celda de flujo volteada



- A. Extremo de salida
- B. Extremo de entrada
- C. Junta (una de cuatro)

Detalles de los cartuchos de tampones, de grupos y de SBS

Los cartuchos de tampones, de grupos y de SBS de NovaSeq 6000Dx cuentan con depósitos con cierre metálico precargados con reactivos, tampones y solución de lavado. Los cartuchos de grupos y de SBS se incluyen con los kits de reactivos NovaSeq 6000Dx. El cartucho de tampones se vende por separado.

Los cartuchos se cargan directamente en el instrumento, y se codifican con colores y etiquetan para reducir los errores de carga. Las guías del cajón del refrigerador de reactivos y del cajón de tampones garantizan la orientación correcta.

Tabla 4 Cartuchos NovaSeq 6000Dx

Consumible	Descripción
 <p>Cartucho de tampones</p>	<p>Precargado con tampones de secuenciación y con un peso de hasta 6,8 kg (15 lb). Un mango de plástico facilita el transporte, la carga y la descarga.</p> <p>El cartucho de tampones contiene reactivos fotosensibles. Mantenga embalado el contenedor de tampones hasta su uso.</p>
 <p>Cartucho de grupos</p>	<p>Precargado con reactivos para la generación de grupos, el indexado y con reactivos “paired-end”, así como con solución de lavado. Incluye una posición designada para el tubo de bibliotecas. El etiquetado naranja distingue el cartucho de grupos del cartucho de SBS.</p> <p>El reactivo de desnaturalización en la posición n.º 30 contiene formamida, que es una amida orgánica y una toxina reproductiva. Para garantizar un desecho seguro de cualquier reactivo no usado tras el experimento de secuenciación, se puede extraer este depósito.</p>
 <p>Cartucho de SBS</p>	<p>Precargado con reactivos de secuenciación en volúmenes específicos para el número de ciclos que admite el kit. Cada una de las tres posiciones de los reactivos tiene una posición contigua reservada para el lavado automático posterior al experimento. El etiquetado gris distingue el cartucho de SBS del cartucho de grupos.</p> <p>El cartucho de SBS contiene reactivos fotosensibles. Mantenga embalado el contenedor de SBS hasta su uso.</p>

Depósitos reservados para cartuchos de grupos

Hay reservados tres depósitos para cebadores personalizados y una posición vacía para el tubo de bibliotecas. Para la trazabilidad de las muestras, el tubo de bibliotecas se carga en el cartucho de grupos durante el proceso de configuración del experimento y permanece en el cartucho hasta la finalización del experimento.

Figura 3 Depósitos numerados

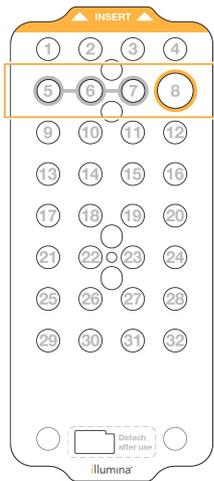


Tabla 5 Depósitos de cartuchos de grupos

Posición	Reservado para
5, 6 y 7	Cebadores personalizados opcionales
8	Tubo de bibliotecas

Consumibles y equipos proporcionados por el usuario

Tabla 6 Consumibles

Consumible	Proveedor	Finalidad
Botella de centrifugado, 500 ml	Proveedor de laboratorio general	Dilución de Tween 20 para un lavado de mantenimiento.
Tubo de centrifugado, 30 ml	Proveedor de laboratorio general	Dilución de NaOCl para un lavado de mantenimiento.
Guantes desechables sin talco	Proveedor de laboratorio general	Usos múltiples.
Paños humedecidos en alcohol isopropilo al 70 % o Paños humedecidos en etanol al 70 %	VWR, n.º de catálogo 95041-714 o equivalente Proveedor de laboratorio general	Limpieza de componentes antes de un experimento y con fines generales.
Toallita de laboratorio sin pelusa	VWR, n.º de catálogo 21905-026, o equivalente	Secado de la platina de la celda de flujo y usos múltiples.

Consumible	Proveedor	Finalidad
NaOCl para reactivos al 5 %	Sigma-Aldrich, n.º de catálogo 239305	Realización de un lavado de mantenimiento.
Puntas de pipeta, 2 µl	Proveedor de laboratorio general	Pipeteo para dilución y carga de bibliotecas.
Puntas de pipeta (20 µl)	Proveedor de laboratorio general	Pipeteo para dilución y carga de bibliotecas.
Puntas de pipeta (200 µl)	Proveedor de laboratorio general	Pipeteo para dilución y carga de bibliotecas.
Puntas de pipeta (1000 µl)	Proveedor de laboratorio general	Pipeteo para dilución y carga de bibliotecas.
Reactivo o alcohol isopropilo de grado espectrofotométrico (99 %), botella de 100 ml	Proveedor de laboratorio general	Limpieza periódica de los componentes ópticos y soporte para el cartucho de limpieza.
Tween 20	Sigma-Aldrich, n.º de catálogo P7949	Realización de un lavado de mantenimiento.
Agua de laboratorio	Proveedor de laboratorio general	Dilución de Tween 20 e hipoclorito sódico para un lavado de mantenimiento.

Tabla 7 Equipo

Elemento	Proveedor
Congelador, entre -25 °C y -15 °C	Proveedor de laboratorio general
Tubo graduado, 500 ml, estéril	Proveedor de laboratorio general
Hielera	Proveedor de laboratorio general
Pipeta (20 µl)	Proveedor de laboratorio general
Pipeta (200 µl)	Proveedor de laboratorio general
Pipeta (1000 µl)	Proveedor de laboratorio general
Frigorífico, entre 2 y 8 °C	Proveedor de laboratorio general
Cubo, baños de agua*	Proveedor de laboratorio general

* Utilice un cubo que pueda alojar dos cartuchos de reactivos y el nivel de agua apropiado. Por ejemplo, 61 cm x 91,4 cm x 25,4 cm (24 in x 36 in x 10 in).

Directrices para el agua de laboratorio

Utilice siempre agua de laboratorio o agua desionizada para llevar a cabo los procedimientos del instrumento. No utilice nunca agua corriente. Utilice solamente los siguientes tipos de agua o equivalentes:

- Agua desionizada
- Illumina PW1
- Agua de 18 megaohmios (MΩ)
- Agua Milli-Q
- Agua Super-Q
- Agua de biología molecular

Instrucciones de uso

Las instrucciones siguientes son para ejecutar la Instrumento NovaSeq 6000Dx en el modo de operación DIV utilizando las configuraciones de kit S2 o S4.

Crear un experimento de secuenciación

Utilice los siguientes pasos para crear un experimento utilizando Illumina Run Manager en modo DIV o RUO. Como alternativa, seleccione **Import Run** (Importar experimento) en la pestaña Planned (Planeados) de la página Runs (Experimentos) e importe una hoja de muestras. Cree nuevos experimentos ya sea en el instrumento o accediendo al Illumina Run Manager con un navegador en un ordenador con conexión a la red.

NOTA La información exacta requerida por cada aplicación de análisis difiere, pero el proceso para crear un experimento incluye los pasos siguientes.

1. En la pestaña Planned (Planeados) de la pantalla Runs (Experimentos), seleccione **Create Run** (Crear experimento).
2. Seleccione una aplicación y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiete).
3. Continúe por las pantallas de configuración. Dependiendo de su aplicación, las pantallas que aparecen pueden incluir las siguientes:
 - **Run Settings** (Ajustes de configuración del experimento): introducción de los parámetros del experimento.
 - **Sample Data** (Datos de la muestra): introducción de los datos de la muestra manualmente o importando un archivo CSV que contenga la información de la muestra. Los nombres de la muestra deben ser únicos.
 - **Analysis settings** (Configuración de los ajustes del análisis): introducción de los ajustes para el análisis.
4. En la pantalla Review (Revisar), revise la información del experimento y seleccione **Save** (Guardar).

El experimento se añade a la parte superior de la lista de experimentos en la pestaña Planned (Planeados).

Preparación de consumibles

Descongelación de cartuchos de SBS y de grupos

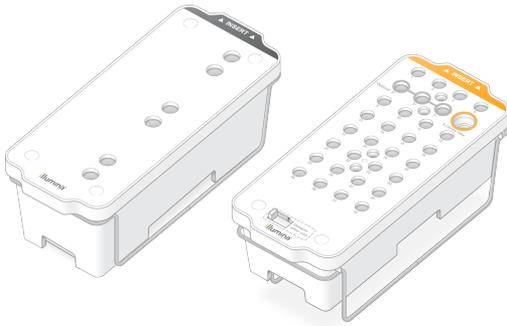


PRECAUCIÓN

El uso de agua caliente para descongelar reactivos podría reducir la calidad de los datos o provocar fallos en el experimento.

1. Si hay un experimento de secuenciación en curso, asegúrese de que ambas partes del instrumento estén disponibles cuando se complete la descongelación.
2. Retire los cartuchos de SBS y de grupos que estén almacenados a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C .
3. Coloque cada cartucho en una gradilla de descongelación de rejilla.
Las gradillas se suministran con el instrumento y evitan vuelcos en el baño de agua.

Figura 4 Cartuchos en gradillas de descongelación de rejilla



4. Utilice la siguiente tabla para determinar la duración de la descongelación.
Descongele los cartuchos de SBS y de grupos en un baño de agua a temperatura ambiente (19 °C a 25 °C) del modo indicado a continuación. Sumerja los cartuchos aproximadamente hasta la mitad.

Cartucho	Duración de la descongelación
Cartucho de SBS S2	4 horas
Cartucho de grupos S2	Hasta 2 horas
Cartucho de SBS S4	4 horas
Cartucho de grupos S4	Hasta 4 horas



PRECAUCIÓN

Si no se inicia la secuenciación en las cuatro horas posteriores a la descongelación de los cartuchos de reactivos, puede producirse una disminución de la calidad de los datos.

5. Seque por completo las bases de los cartuchos utilizando papeles absorbentes. Seque entre los pocillos de forma que se elimine toda el agua.
6. Inspeccione los cierres metálicos en busca de agua. Si hay agua, séquela con una toallita sin pelusa.
7. Inspeccione la parte inferior de cada cartucho para asegurarse de que los depósitos no tengan hielo, lo que indica que los reactivos están descongelados.
8. Voltee cada cartucho 10 veces para mezclar los reactivos.



PRECAUCIÓN

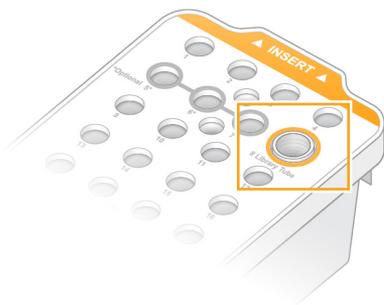
No voltear completamente los cartuchos puede dar lugar a una disminución de la calidad de los datos.

9. Golpee suavemente el fondo de cada cartucho en la mesa para reducir las burbujas de aire.

Carga del tubo de bibliotecas

1. Sin alterar la biblioteca en el fondo del tubo, introduzca el tubo de bibliotecas destapado que contiene la agrupación de bibliotecas desnaturalizadas y diluidas en la posición **Library Tube** (Tubo de bibliotecas) (la n.º 8) del cartucho de grupos.
2. Inserte el tubo de bibliotecas en la posición n.º 8 del cartucho de grupos.

Figura 5 Tubo de bibliotecas destapado en la posición n.º 8



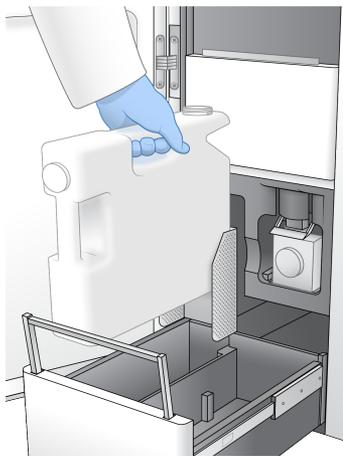
Vaciado de botellas de reactivos utilizados

Siga las instrucciones que aparecen a continuación para vaciar las botellas de reactivos utilizados en *cada* experimento de secuenciación. Si su sistema está configurado para enviar reactivos utilizados al exterior, la botella pequeña recoge los reactivos utilizados y debe vaciarse en cada experimento de secuenciación. La

botella grande debe estar colocada.

1. Retire y vacíe la botella pequeña de reactivos utilizados como se indica a continuación.
 - a. Levante la palanca y retire la botella pequeña de reactivos utilizados del hueco. Sujete la botella por los lados.
 - b. Retire la tapa roscada del soporte correspondiente situado en la parte delantera de la botella.
 - c. Cierre la abertura de la botella con la tapa para evitar que se derrame.
 - d. Mantenga el contenido apartado del contenido de la otra botella y deséchelo de conformidad con las normativas aplicables de su región.
 - e. Vuelva a colocar la botella destapada en el hueco y baje la palanca. Guarde la tapa en el soporte destinado a tal efecto.
2. Retire y vacíe la botella grande de reactivos utilizados como se indica a continuación.
 - a. Con la ayuda del mango superior, retire la botella grande de reactivos utilizados del lado izquierdo del cajón de tampones.
 - b. Retire la tapa roscada del soporte correspondiente situado en la parte delantera de la botella.
 - c. Cierre la abertura de la botella con la tapa para evitar que se derrame.
 - d. Deseche el contenido de conformidad con las normativas pertinentes de su región. Sujete los mangos durante el vaciado.
 - e. Vuelva a colocar la botella destapada en el cajón de tampones. Guarde la tapa en el soporte destinado a tal efecto.

Figura 6 Devolución de la botella vacía



3. Utilice un nuevo par de guantes sin talco.



PRECAUCIÓN

Póngase siempre un nuevo par de guantes tras manipular la botella de reactivos utilizados.

4. Cierre el cajón de tampón y, después, cierre las puertas del compartimento de líquidos.



PRECAUCIÓN

Si no vacía las botellas de reactivos utilizados puede interrumpir el experimento y producirse un desbordamiento, lo que dañaría el instrumento y constituiría un riesgo para la seguridad.

Preparación de la celda de flujo

1. Extraiga un nuevo embalaje de celda de flujo en caja de su almacenamiento a una temperatura entre 2 °C y 8 °C.
2. Deje el embalaje sellado de celda de flujo a temperatura ambiente (19 °C a 25 °C) durante 10 a 15 minutos. Utilice la celda de flujo en un plazo de 12 horas desde su extracción del embalaje.

Carga de consumibles

Utilice las instrucciones siguientes para iniciar la configuración del experimento y la carga de consumibles.

1. En el menú principal, seleccione **Sequence** (Secuenciar) y, después, elija una sola celda de flujo o una celda de flujo doble del modo indicado a continuación.
 - **A+B:** Configura un experimento con una celda de flujo doble.
 - **A:** Configura una sola celda de flujo en el lado A.
 - **B:** Configura una sola celda de flujo en el lado B.

El sistema inicia la configuración del experimento, que comienza con la carga de la celda de flujo.

2. Seleccione **OK** (Aceptar) para aceptar la advertencia y abrir la puerta de la celda de flujo.



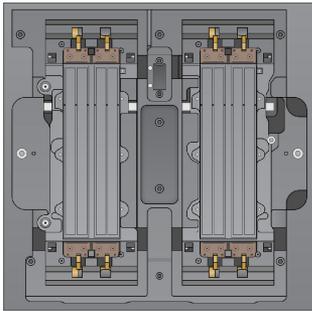
PRECAUCIÓN

Mantenga la superficie libre durante el experimento de secuenciación y evite apoyarse en el instrumento. Cualquier presión sobre la puerta de la celda de flujo puede hacer que se abra, lo que detendría el experimento. Los experimentos detenidos no se pueden reanudar.

Carga de la celda de flujo

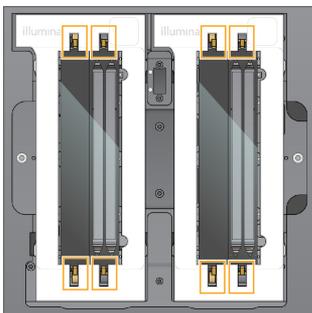
1. Si está presente, retire la celda de flujo del experimento anterior.
2. Si hay partículas visibles en la platina de la celda de flujo, con un paño humedecido en alcohol, límpiela entera, incluidas la interfaz de fluídica y la superficie de vidrio del objetivo de alineación óptica. Séquela mediante una toallita sin pelusa.

Figura 7 Platina de la celda de flujo



3. Extraiga la celda de flujo del embalaje del modo indicado a continuación.
 - a. Póngase un par de guantes nuevos sin polvo para evitar contaminar la superficie de vidrio de la celda de flujo.
 - b. Con el paquete en una superficie plana, abra el envase metálico tirando de la lengüeta de la esquina.
 - c. Quite el retenedor de plástico transparente que cubre la celda de flujo.
 - d. Extraiga la celda de flujo del embalaje. Sujete la celda de flujo por los laterales sin tocar el vidrio ni las juntas de la parte inferior.
 - e. Si hay partículas visibles en alguna de las superficies de vidrio, límpiela con un paño sin pelusa humedecido en alcohol y séquela con una toallita de laboratorio sin pelusa.
 - f. Deseche el embalaje de manera adecuada.
4. Alinee la celda de flujo con respecto a las cuatro abrazaderas levantadas y colóquela en la platina de la celda de flujo.

Figura 8 Celdas de flujo cargadas alineadas sobre las abrazaderas



5. Seleccione **Close Flow Cell Door** (Cerrar puerta de la celda de flujo).
La puerta de la celda de flujo se cierra, se comprueban los sensores y el RFID, y aparece en la pantalla el ID de la celda de flujo.

Carga de los cartuchos de SBS y de grupos

1. Abra las puertas del compartimento de líquidos y, a continuación, la puerta del refrigerador de reactivos.
2. Extraiga los cartuchos SBS y de grupos usados del experimento anterior si todavía no lo ha hecho.
Los cierres metálicos de los cartuchos utilizados están perforados.

3. Deseche el contenido no usado de conformidad con las normativas aplicables.
Para desechar de forma segura la posición n.º 30 del cartucho de grupos, consulte [Desacople de la posición n.º 30 en la página 21](#).
4. Cargue los cartuchos preparados en el cajón del refrigerador de reactivos como se indica a continuación, de modo que las etiquetas Insert (Insertar) estén orientadas hacia la parte trasera del instrumento.
 - Coloque el cartucho de SBS (etiqueta gris) en la posición izquierda.
 - Coloque el cartucho de grupos (etiqueta naranja) que contiene el tubo de bibliotecas destapado en la posición derecha.

Figura 9 Cartuchos de reactivos cargados

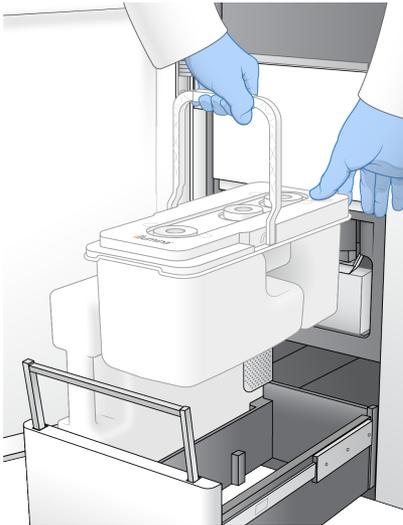


5. Deslice el cajón para introducirlo en el refrigerador de reactivos y, seguidamente, cierre la puerta de este. Se comprueban los sensores y los RFID. Los ID del tubo de bibliotecas y los dos cartuchos aparecerán en la pantalla.

Carga del cartucho de tampones

1. Tire del mango de metal para abrir el cajón de tampones.
2. Retire el cartucho de tampones utilizados del lado derecho del cajón de tampones.
Los cierres metálicos del cartucho de tampones utilizados están perforados.
3. Coloque un nuevo cartucho de tampones en el cajón de forma que la etiqueta Illumina esté orientada a la parte delantera del cajón. Alinee el cartucho con las guías levantadas en la base y los lados del cajón.
Una vez que el cartucho de tampones esté cargado y debidamente fijado, puede cerrarse el cajón.

Figura 10 Carga del cartucho de tampones



4. Si las dos botellas de reactivos utilizados se han vaciado, seleccione la casilla de verificación que sirve para dejar constancia de que ambas botellas de reactivos utilizados están vacías.

NOTA Si no vacía las botellas de reactivos utilizados puede interrumpir el experimento y producirse un desbordamiento, lo que dañaría el instrumento y constituiría un riesgo para la seguridad.

5. Cuando se hayan añadido los consumibles, seleccione **Run Selection** (Selección del experimento) para continuar.

Seleccionar e iniciar el experimento

El instrumento lee el ID del tubo de bibliotecas y busca un experimento planeado coincidente.

1. Si se encuentra un experimento planeado que coincida con el ID del tubo de bibliotecas para cada lado que se utilice, se omite la selección del experimento. Seleccione **Review** (Revisar) para continuar.
2. Si no hay un experimento coincidente para uno o ambos lados, seleccione **Run Selection** (Selección del experimento), y a continuación seleccione uno o más experimentos planeados. No puede seleccionarse el mismo experimento planeado en ambos lados.
3. Una vez seleccionados uno o más experimentos, seleccione **Pre-Run Checks** (Comprobaciones previas al experimento).
4. Espere aproximadamente 5 minutos a que finalicen las comprobaciones previas al experimento. El experimento comienza de manera automática después de finalizar correctamente las comprobaciones.

NOTA Para evitar un sobrellenado del disco duro, no copie ningún dato en C:\ después de iniciar el experimento.

Errores de la comprobación previa al experimento

1. Si las comprobaciones previas al experimento fallan debido a un error del sensor, como que la celda de flujo no se detecta, debe salir y reiniciar el flujo de trabajo.
2. Para otros fallos de las comprobaciones previas al experimento, seleccione **Retry** (Reintentar) para reiniciar una comprobación con error o **Retry All** (Reintentar todo) para reiniciar todas las comprobaciones. Hay que solucionar los errores antes de poder iniciar el experimento.
3. Seleccione el icono de **Error** para ver los detalles del error.
4. Si falla la comprobación de alineación, solucione los errores de la siguiente manera.
 - a. Seleccione **Reload** (Volver a cargar) y, a continuación, **OK** (Aceptar) para regresar a la pantalla Load (Cargar).
 - b. Retire cualquier elemento de encima del instrumento y, después, seleccione **OK** (Aceptar). Se abre la puerta de la celda de flujo.
 - c. Vuelva a cargar la celda de flujo y, después, seleccione **Run Setup** (Configuración del experimento).
 - d. Navegue por las pantallas para volver a leer cada RFID y regrese a la pantalla Pre-Run Checks (Comprobaciones previas al experimento).
 - e. Vuelva a realizar la comprobación.

Supervisión del progreso del experimento

Los siguientes detalles se muestran en la pantalla Sequencing (Secuenciación) mientras el experimento está en curso. Se accede a la pantalla Sequencing (Secuenciación) a través del menú principal.

- **Estado de los pasos individuales del experimento**
- **Time to completion** (Tiempo hasta la finalización): Muestra la fecha y la hora (aaaa-mm-dd hh:mm) de finalización del experimento.
- **Run progress** (Progreso del experimento): El paso actual del experimento. El tamaño de la barra de progreso no es proporcional a la velocidad del experimento de cada paso.
- **Q-scores** (Puntuaciones Q): La distribución de las puntuaciones de calidad (puntuaciones Q).
- **Intensity** (Intensidad): El valor de las intensidades de grupos del percentil 90 para cada placa. Los colores de los diagramas indican los canales verde y rojo.
- **Clusters passing filter (%)** (Grupos que superan el filtro [%]): El porcentaje de grupos que superan el filtro.
- **Projected Total Yield (GB)** (Rendimiento total proyectado [GB]): El rendimiento proyectado para el experimento de celda de flujo. Si se seleccionan los datos de medición por carril (H), los números mostrados representan el rendimiento actual por carril y se actualizan en cada ciclo durante el experimento.
- **Q30**: El porcentaje de llamada de bases para el experimento que tiene una puntuación Q ≥ 30 .

Iconos de estado

Un icono de estado en la interfaz de NVOS indica el estado del experimento. Un número en el icono indica el número de condiciones para un estado.

Cuando cambia el estado de un experimento, el icono parpadea. Seleccione el icono para visualizar una descripción del estado. Seleccione **Acknowledge** (Aceptar) para que desaparezca el mensaje y a continuación **Close** (Cerrar) para salir del cuadro de diálogo.

Icono de estado	Nombre de estado	Descripción
	Estado correcto	El sistema está normal.
	Procesando	El sistema está procesando.
	Advertencia	Se ha producido una advertencia y es necesaria su atención. Las advertencias no detienen un experimento ni requieren una acción antes de continuar.
	Error	Se ha producido un error. Los errores precisan una acción antes de continuar con el experimento.
	Información	Hay un mensaje no crítico disponible.

Criterios de medición del experimento

El software muestra los datos de medición que se hayan generado durante el experimento. Estos datos aparecen en forma de diagramas, gráficos y tablas según los datos generados por RTA3 y escritos en los archivos InterOp.

La generación de grupos dura aproximadamente 2 horas, y a continuación comienza la secuenciación con el ciclo 1. Los datos se actualizan conforme avanza la secuenciación. Los grupos que superan el filtro, el rendimiento y las puntuaciones de calidad están disponibles después del ciclo 26. Antes del ciclo 26, no se rellena ningún valor y estos se designan como no aplicables.

Después de la secuenciación

Las secciones siguientes proporcionan instrucciones sobre los siguientes pasos una vez completada la secuenciación.

Lavado automático posterior al experimento

Al término de la secuenciación, el software inicia un lavado automático posterior al experimento que dura aproximadamente 80 minutos. El sistema dispensa hipoclorito sódico (NaOCl) al 0,24 % desde la posición n.º 17 y lo diluye hasta el 0,12 %. El NaOCl al 0,12 % se dispensa a las posiciones de las bibliotecas y los reactivos ExAmp a través de la celda de flujo y, a continuación, a las botellas de reactivos utilizados. El lavado enjuaga la cadena molde del sistema para evitar la contaminación cruzada.

Cuando el lavado finaliza, el sistema se coloca en un lugar seguro y el botón de inicio se activa. Deje los consumibles en su sitio hasta el siguiente experimento. Después del lavado, los dispensadores permanecen en los cartuchos de SBS y de grupos con el fin de evitar que entre aire en el sistema. Los dispensadores del cartucho de tampones se elevan para que las botellas de reactivos utilizados puedan vaciarse. Se bombea a continuación tampón de lavado por todos los conductos para eliminar del sistema el NaOCl y los reactivos.

NOTA Si se produce un error durante un lavado automático posterior al experimento y este se queda por terminar, hay que realizar un lavado de mantenimiento.

Desacople de la posición n.º 30

El depósito en la posición n.º 30 del cartucho de grupos contiene formamida. Se retira del cartucho de grupos utilizado y se desecha por separado.



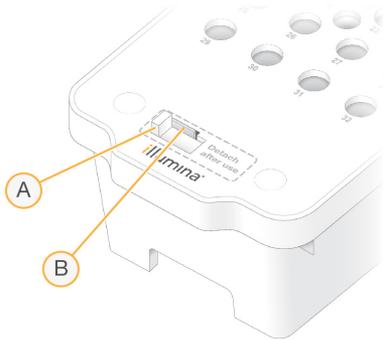
PRECAUCIÓN

Este conjunto de reactivos contiene sustancias químicas que pueden ser peligrosas. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Utilice un equipo de protección, incluidos gafas, guantes y batas de laboratorio adecuados para el riesgo de exposición. Manipule los reactivos utilizados como residuos químicos y deséchelos de conformidad con las normativas y leyes regionales, nacionales y locales aplicables. Para obtener más información sobre seguridad, salud y medioambiente, consulte la hoja de datos de seguridad en support.illumina.com/sds.html.

1. Con unos guantes puestos, empuje la lengüeta de plástico con la etiqueta **Detach after use** (Desacoplar después del uso) a la derecha.
2. Coloque una mano o una superficie sólida debajo del depósito y presione la lengüeta de plástico transparente hacia la etiqueta de Illumina para liberar el depósito de debajo del cartucho de grupos.

NOTA Evite apilar grupos de cartuchos cuando los vaya a almacenar, ya que se podría salir el depósito por accidente.

Figura 11 Posición n.º 30 extraíble



- A. Lengüeta de plástico blanca para desacople
- B. Lengüeta de plástico transparente para liberación

3. Deseche el depósito de conformidad con las normativas aplicables.

Resultados de secuenciación

Durante la secuenciación, los datos se transfieren automáticamente del Instrumento NovaSeq 6000Dx al Servidor DRAGEN de Illumina. Cuando finaliza el análisis primario y se ha completado la transferencia de los datos, el análisis secundario en el Servidor DRAGEN de Illumina puede comenzar automáticamente utilizando las opciones de análisis definidas por la aplicación seleccionada en Illumina Run Manager. Los resultados producidos dependen de las opciones elegidas durante la configuración del experimento. Para ver los resultados de un experimento, seleccione el nombre del experimento que desee en la pestaña Completed (Finalizados) de la pantalla Runs (Experimentos). Puede encontrar también los archivos de resultados en la ubicación especificada en la pantalla Instrument Settings (Configuración del instrumento).

Análisis en tiempo real

El Instrumento NovaSeq 6000Dx ejecuta RTA3, una implementación del software Análisis en tiempo real, en el motor informático (CE) del instrumento. RTA3 extrae las intensidades de las imágenes recibidas de la cámara, realiza la llamada de bases, asigna una puntuación de calidad a las llamadas de bases, se alinea con PhiX y genera informes de datos en archivos InterOp.

Para optimizar el tiempo de procesamiento, RTA3 almacena información en memoria. Si se interrumpe RTA3, el procesamiento no se reanuda y se pierden los datos del experimento que se estén procesando en la memoria.

Entradas RTA3

RTA3 requiere las imágenes de las placas contenidas en la memoria del sistema local para su procesamiento. RTA3 recibe información del experimento y comandos del NVOS.

Salidas RTA3

Las imágenes de cada canal de color se transfieren en memoria a RTA3 como placas. A partir de estas imágenes, RTA3 produce un conjunto de archivos de filtro y archivos de llamada de bases con puntuación de calidad. Todos los demás conjuntos admiten archivos de resultados.

Tipo de archivo	Descripción
Archivos de llamada de bases	Cada placa que se analiza se incluye en un archivo de llamada de bases concatenado (*.cbcl). Las placas del mismo carril y superficie se agregan a un archivo CBCL para cada carril y superficie.
Archivos de filtro	Cada placa produce un archivo de filtro (*.filter) que especifica si un grupo pasa filtros.

RTA3 ofrece datos en tiempo real sobre la calidad del experimento almacenados como archivos InterOp, que son archivos binarios de resultados que contienen datos de medición sobre placas, ciclos y niveles de lectura.

Gestión de errores

RTA3 crea archivos de registro y los guarda en la carpeta de registros. Los errores se registran en un archivo de texto con formato *.log.

Los archivos de registro siguientes se transfieren a la ubicación de destino de los resultados finales tras completar el procesamiento:

- `info_00000.log` contiene un resumen de los eventos importantes del experimento.
- `error_00000.log` enumera los errores que se han producido durante un experimento.
- `warning_00000.log` enumera las advertencias que se han producido durante un experimento.

Placas de la celda de flujo

Las placas son pequeñas áreas de adquisición de imágenes en la celda de flujo. La cámara toma una imagen de cada sector, que el software divide en placas para el procesamiento de RTA3. El número total de placas depende de la cantidad de imágenes de carriles, sectores y superficies que se adquieran en la celda de flujo.

- Las celdas de flujo S2 tienen un total de 1408 placas.
- Las celdas de flujo S4 tienen un total de 3744 placas.

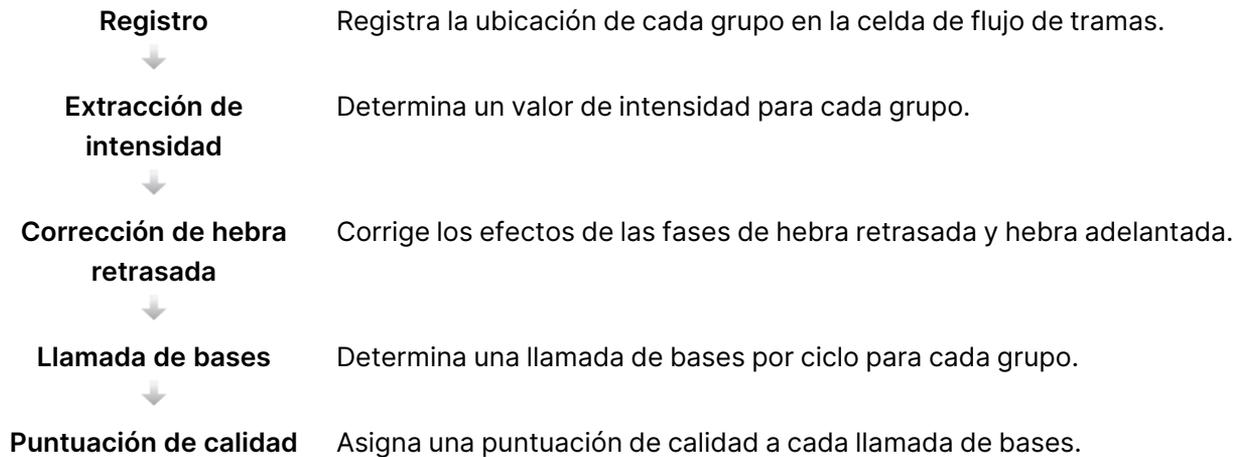
Componente de la celda de flujo	S2	S4	Descripción
Carriles	2	4	Un carril es un canal físico con puertos de entrada y salida.

Componente de la celda de flujo	S2	S4	Descripción
Superficies	2	2	Las imágenes de las celdas de flujo S2 y S4 se adquieren en dos superficies: la superior y la inferior. En primer lugar, se adquieren imágenes de la superficie superior de una placa.
Sectores por carril	4	6	Un sector es una columna del carril de una celda de flujo que la cámara captura como una imagen leída.
Placas por sector	88	78	Una placa es una porción de un sector y describe un área de la celda de flujo cuya imagen se ha adquirido.
Total de placas generadas	1408	3744	Carriles × superficies × sectores × placas por cada sector equivale al número total de placas.

El nombre de la placa contiene un número de cinco dígitos que representa la posición de la placa en la celda de flujo. Por ejemplo, el nombre de placa 1_1205 indica la superficie superior del carril 1, el sector 2 y la placa 5.

- El primer dígito es el número de carril:
 - 1 o 2 para una celda de flujo S2.
 - 1, 2, 3 o 4 para una celda de flujo S4.
- El segundo dígito representa la superficie: 1 para la parte superior o 2 para la inferior.
- El tercer dígito representa el número de sector:
 - 1, 2, 3 o 4 para una celda de flujo S2.
 - 1, 2, 3, 4, 5 o 6 para una celda de flujo S4.
- Los dos últimos dígitos representan el número de placa. La numeración comienza por 01 en el extremo de salida de la celda de flujo hasta 88 o 78 en el extremo de entrada.
 - De 01 a 88 para una celda de flujo S2.
 - De 01 a 78 para una celda de flujo S4.

Flujo de trabajo de análisis en tiempo real



Registro

El registro alinea una imagen con la matriz cuadrada girada de nanopocillos en la celda de flujo de tramas. Debido a la disposición ordenada de los nanopocillos, las coordenadas X e Y para cada grupo de una placa están predeterminadas. Las posiciones de los grupos se recopilan en un archivo de ubicación de grupos (s.locs) para cada experimento.

Si se produce un error en el registro de cualquier imagen en un ciclo, no se generará ninguna llamada de bases para esa placa en ese ciclo.

Extracción de intensidad

Tras el registro, la extracción de intensidad calcula un valor de intensidad para cada nanopocillo en una imagen determinada. Si el registro falla, no es posible extraer la intensidad para dicha placa.

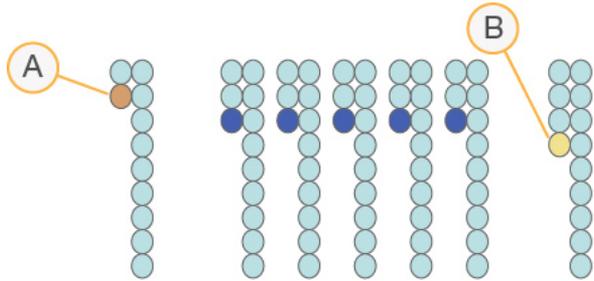
Corrección de hebra retrasada

Durante la reacción de secuenciación, cada cadena de ADN de un grupo se amplía en una base por cada ciclo. Las fases de hebra retrasada y hebra adelantada se producen cuando una cadena queda fuera de su lugar con respecto al ciclo de incorporación.

La fase de hebra retrasada se produce cuando la incorporación de una base se atrasa.

La fase de hebra adelantada se produce cuando la incorporación de una base se avanza.

Figura 12 Fases de hebra retrasada y de hebra adelantada



- A. Lectura con una base con fase de hebra retrasada
- B. Lectura con una base con fase de hebra adelantada

RTA3 corrige los efectos de las fases de hebra retrasada y adelantada, lo que aumenta al máximo la calidad de los datos en cada uno de los ciclos del experimento.

Llamada de bases

La llamada de bases determina una base (A, C, G o T) para cada grupo de una placa determinada en un ciclo específico. Instrumento NovaSeq 6000Dx utiliza secuenciación de dos canales, que precisa solo dos imágenes para codificar los datos de cuatro bases de ADN: una imagen del canal verde y una imagen del canal rojo.

Una ausencia de llamada se identifica como N. Las ausencias de llamadas se producen cuando un grupo no supera el filtro, el registro falla o se desplaza un grupo fuera de la imagen.

Las intensidades de cada grupo se extraen de la imagen roja y de la verde y se comparan una con otra, lo que produce cuatro poblaciones diferenciadas. Cada población se corresponde con una base. El proceso de llamada de bases determina a qué población pertenece cada grupo.

Figura 13 Visualización de intensidades de grupos

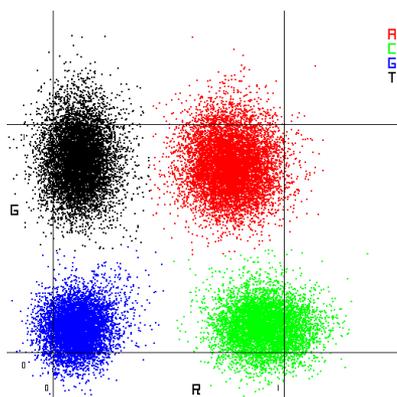


Tabla 8 Llamada de bases en secuenciación de dos canales

Base	Canal rojo	Canal verde	Resultado
A	1 (encendido)	1 (encendido)	Los grupos que presentan intensidad en los canales rojo y verde.
C	1 (encendido)	0 (apagado)	Los grupos que presentan intensidad solo en el canal rojo.
G	0 (apagado)	0 (apagado)	Grupos que no presentan intensidad en una ubicación de grupos conocida.
T	0 (apagado)	1 (encendido)	Los grupos que presentan intensidad solo en el canal verde.

Grupos que superan el filtro

Durante el experimento, RTA3 filtra los datos sin procesar para eliminar las lecturas que no satisfagan el umbral de calidad de los datos. Los grupos que se solapan o de baja calidad se eliminan.

En el caso del análisis de dos canales, RTA3 utiliza un sistema basado en la población para determinar la castidad (medición de pureza de la intensidad) de una llamada de bases. Los grupos que superan el filtro (PF) cuando solo una llamada de bases de los primeros 25 ciclos tiene un valor de castidad inferior al umbral fijado. Si se incluye, la alineación de PhiX se lleva a cabo en el ciclo 26 en un subconjunto de placas de grupos que superan el filtro. Los grupos que no superan el filtro no se alinean ni se realiza en ellos la llamada de bases.

Puntuaciones de calidad

Una puntuación de calidad (puntuación Q) es una predicción de la probabilidad de obtener una llamada de bases incorrecta. Una puntuación Q superior implica que la llamada de bases tiene una calidad mayor y es más probable que sea correcta. Tras determinar la puntuación Q, los resultados se registran en archivos CBCL.

La puntuación Q comunica brevemente pequeñas probabilidades de error. Las puntuaciones de calidad se representan como Q(X), donde X es la puntuación. En la siguiente tabla, figura la relación entre una puntuación de calidad y la probabilidad de error.

Puntuación Q, Q(X)	Probabilidad de error
Q40	0,0001 (1 entre 10 000)
Q30	0,001 (1 entre 1000)
Q20	0,01 (1 entre 100)
Q10	0,1 (1 entre 10)

Puntuación de calidad y generación de informes

Para la puntuación de calidad, se calcula un conjunto de predictores para cada llamada de bases y, a continuación, se utilizan los valores de los predictores para determinar la puntuación Q en la tabla de calidad. Las tablas de calidad se crean para proporcionar predicciones de calidad con una precisión óptima de experimentos generados mediante una configuración específica de la plataforma de secuenciación y una versión de composición química concreta.

La puntuación de calidad se basa en una versión modificada del algoritmo Phred.

Para generar la tabla Q del Instrumento NovaSeq 6000Dx, se determinaron tres grupos de llamadas de bases en función del agrupamiento de estas características predictivas específicas. Después de la agrupación de las llamadas de bases, se calculó empíricamente la tasa de error media de cada uno de los tres grupos y las puntuaciones Q correspondientes se registraron en la tabla Q junto con las características predictivas que se correlacionan con ese grupo. Como tal, solo son posibles tres puntuaciones Q con RTA3, y estas puntuaciones Q representan la tasa de error promedio del grupo. En general, esto da como resultado una puntuación de calidad simplificada, pero muy precisa. Los tres grupos de la tabla de calidad se corresponden a llamadas de bases de calidad marginal (< Q15), media (aprox. Q20) y alta (> Q30), y se les asignan puntuaciones específicas de 12, 26 y 34, respectivamente. Además, se asigna una puntuación nula de 2 en caso de ausencia de llamadas. El modelo de elaboración de informes de puntuaciones de calidad (puntuaciones Q) reduce los requisitos de espacio de almacenamiento y ancho de banda sin detrimento de la precisión o el rendimiento.

Figura 14 Puntuación Q simplificada con RTA3



Archivos de resultados de secuenciación

Tipo de archivo	Descripción, ubicación y nombre del archivo
Archivos de llamada de bases	Cada grupo analizado se incluye en un archivo de llamada de bases, agregado en un archivo para cada ciclo, carril y superficie. El archivo agregado contiene la llamada de bases y la puntuación de calidad codificada para cada grupo. Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[lane]_[surface].cbcl, por ejemplo L001_1.cbcl
Archivos de ubicación de grupos	Para cada celda de flujo, un archivo binario de ubicación de grupos contiene las coordenadas X e Y para los grupos en una placa. Una disposición hexagonal que coincide con la disposición de nanopocillos de la celda de flujo define previamente las coordenadas. Data\Intensities (Datos\Intensidades) s_[lane].locs
Archivos de filtro	El archivo de filtro especifica si los grupos han superado los filtros. Estos archivos se generan en el ciclo 26 mediante el uso de 25 ciclos de datos. Para cada placa, se genera un archivo de filtro. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[lane]_[tile].filter
Archivo de información del experimento	Indica el nombre del experimento, el número de ciclos de cada lectura, si la lectura es una Lectura del índice, y el número de sectores y placas de la celda de flujo. El archivo de información del experimento se crea al inicio del experimento. [Root folder],RunInfo.xml
Archivos de vistas en miniatura	Imágenes en miniatura para el primer ciclo de cada lectura de secuenciación. Thumbnail_Images\L001\C[X.1]: Los archivos se almacenan en una subcarpeta para cada ciclo. s_[lane]_[tile]_[channel].jpg: La imagen en miniatura incluye el número de placa.

Estructura de carpetas de resultados de secuenciación

El NVOS genera el nombre de la carpeta de resultados de forma automática.

 **Config** (Configuración): parámetros de configuración del experimento.

 **Logs** (Registros): archivos de registro que describen los pasos operativos, los análisis del instrumento y los eventos de RTA3.

 SampleSheet.csv: hoja de muestras u otro archivo adjunto, si procede.

 **Data (Datos)**

 **Intensities (Intensidades)**

 **BaseCalls (Llamadas de bases)**

L00[X]: archivos de llamada de bases (*.cbcl) agregados en un archivo por carril, superficie y ciclo.

s.locs: el archivo de ubicaciones de grupo para el experimento.

InterOp: archivos binarios.

Recipe (Fórmula): archivo de la fórmula específica del experimento.

Thumbnail Images (Imágenes en miniatura): imágenes en miniatura cada 10 placas.

LIMS: el archivo de configuración del experimento (*.json), si procede.

Audit (Auditoría)

AuditInfo.xml

RTA3.cfg

RunInfo.xml

RunParameters.xml

RTAComplete.txt

CopyComplete.txt

SequenceComplete.txt

IlluminaRunManagerCopyComplete.txt

Manifest.tsv

Advertencias y precauciones



PRECAUCIÓN

Las leyes federales limitan la venta de este dispositivo a médicos u otros facultativos, o bajo prescripción de estos, que se encuentren autorizados en virtud de la legislación del estado en el que ejercen su profesión para utilizar u ordenar la utilización de este dispositivo.

- **Algunos componentes de los reactivos proporcionados por Illumina que se usan con el instrumento Instrumento NovaSeq 6000Dx contienen sustancias químicas potencialmente peligrosas. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Utilice un equipo de protección, incluidos gafas, guantes y batas de laboratorio adecuados para el riesgo de exposición. Manipule los reactivos utilizados como residuos químicos y deséchelos de conformidad con las normativas y leyes regionales, nacionales y locales aplicables.** Para obtener más información medioambiental, sanitaria y de seguridad, consulte la hoja de datos de seguridad (Safety Data Sheet, SDS) en support.illumina.com/sds.html.
- El incumplimiento de los procedimientos descritos puede provocar resultados erróneos o una reducción considerable de la calidad de las muestras.

- Utilice las precauciones rutinarias del laboratorio. No pipetee con la boca. No coma, beba ni fume en las zonas de trabajo designadas. Lleve guantes desechables y batas de laboratorio para la manipulación de muestras y los reactivos del kit. Lávese bien las manos tras la manipulación de muestras y reactivos del kit.
- Se precisan prácticas de laboratorio adecuadas y procedimientos óptimos en materia de higiene de laboratorio para evitar que los productos de PCR contaminen los reactivos, los instrumentos y las muestras de ADN genómico. La contaminación mediante PCR puede conllevar resultados imprecisos y poco fiables.
- Para evitar la contaminación, asegúrese de que las zonas de preamplificación y posamplificación dispongan de equipos y consumibles específicos (tales como pipetas, puntas de pipeta, bloques calientes, mezcladores vorticiales y centrifugadoras).
- El emparejamiento de índice a muestra requiere una coincidencia exacta con la disposición de la placa de índices. La aplicación DNA Prep with Enrichment completa de forma automática los cebadores de índices que se han asociado a los nombres de las muestras cuando estos se introducen durante la configuración del experimento. Es aconsejable que el usuario haga una comprobación de los cebadores de índices que se han asociado a las muestras antes de comenzar el experimento de secuenciación. Las discrepancias entre los resultados de disposición de muestras y de la placa pueden provocar que no se identifiquen las muestras positivas y la generación de informes con resultados incorrectos.
- Se recomienda encarecidamente instalar un software antivirus proporcionado por el usuario para proteger el ordenador frente a virus informáticos.
- No utilice el NovaSeq 6000Dx si se ha retirado alguno de los paneles. Poner en funcionamiento el instrumento estando alguno de estos paneles retirado constituye una posible exposición a la tensión de línea, así como a tensiones de CC.
- No toque la platina de la celda de flujo en el compartimento de la celda de flujo. El calentador de este compartimento funciona a una temperatura de entre 22 °C y 95 °C, por lo que podría causar quemaduras.
- El instrumento pesa aproximadamente 481 kg (1059 lbs) y podría provocar lesiones graves si se cae o se maneja de forma indebida.

Características de rendimiento

Las características de rendimiento para el instrumento NovaSeq 6000Dx se establecieron utilizando el Illumina DNA Prep with Enrichment Dx para la preparación de bibliotecas, el Kit de reactivos S2 v1.5 para NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) y el Kit de reactivos S4 v1.5 para NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) para la secuenciación, y la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx para el análisis secundario, incluidas la detección de variantes Germline (germinal) y Somatic (somática). Los estudios incluían indexación de muestras, arrastre de muestras, entrada de ADN, sensibilidad del análisis (límite del blanco/límite de detección), exactitud, precisión, comparación de métodos y reproducibilidad. Consulte *Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx* para conocer las características relacionadas con los factores preanalíticos, por ejemplo, los métodos de extracción o las sustancias interferentes.

Definiciones de los cálculos que se utilizan en las características de rendimiento

1. La coincidencia de porcentaje positivo (PPA, Positive Percent Agreement) se calcula como la proporción de locus que se clasifican como variantes usando un método de referencia y que se detectan de forma correcta en el ensayo.
 - $(N.^{\circ} \text{ de locus en los que se han detectado variantes de forma correcta en el ensayo}) / (\text{cantidad total de locus en los que existen variantes})$

Los locus en los que se han detectado variantes en el ensayo y que coinciden con el método de referencia son positivos verdaderos (TP, True Positives). Los locus en los que se han detectado variantes como llamadas de referencia o como distintas llamadas de variantes en el ensayo son falsos negativos (FN, False Negative).
2. La coincidencia de porcentaje negativo (NPA, Negative Percent Agreement) se calcula como la proporción de locus que se clasifican como en estado natural por medio de un método de referencia y que se detectan de forma correcta en el ensayo.
 - $(N.^{\circ} \text{ de locus en estado natural detectados de forma correcta en el ensayo}) / (n.^{\circ} \text{ total de locus en estado natural})$

Los locus en estado natural que se han detectado en el ensayo y que concuerdan con el método de referencia son negativos verdaderos (TN). Los locus en estado natural que en el ensayo se detectan como variantes son falsos positivos (FP, False Positive).
3. La coincidencia total de porcentajes (OPA, Overall Percent Agreement) se calcula como la proporción de locus que se detectan correctamente en el ensayo con respecto al método de referencia.
 - $([N.^{\circ} \text{ de locus en los que se han detectado variantes de forma correcta en el ensayo}] + [n.^{\circ} \text{ de locus en estado natural detectados de forma correcta en el ensayo}]) / ([n.^{\circ} \text{ total de locus en los que existen variantes}] + [n.^{\circ} \text{ total de locus en estado natural}])$
4. Los cálculos que se llevan a cabo para determinar la PPA, la NPA y la OPA no incluyen la ausencia de llamadas (locus de referencia o en los que existen variantes que no pasan uno o varios filtros de calidad).
5. El porcentaje de llamadas positivas (PPC) es el número de observaciones con la variante detectada dividido por el número total de observaciones analizadas, excluyendo las observaciones no válidas o las filtradas como de baja profundidad.
6. El porcentaje de llamadas negativas (PNC) se calcula como el número de observaciones con una referencia que supera el filtro como resultado en una posición, dividido por el número total de observaciones analizadas, excluyendo las observaciones no válidas o las filtradas como de baja profundidad.
7. El porcentaje de capacidad de llamada de autosomas se calcula como el porcentaje de posiciones de referencia no-N en las regiones de interés en cromosomas autosómicos con una llamada de genotipo que supera el filtro.

Indexación de muestras

Los cebadores de índice de muestras, añadidos durante la preparación de bibliotecas, asignan una secuencia única a cada ADN de muestra. Estas secuencias únicas permiten agrupar varias muestras en un único experimento de secuenciación. La indexación de muestras se usa en los flujos de trabajo tanto de Germline (germinal) como Somatic (somática). El objetivo de este estudio fue establecer el número mínimo (12) y máximo (192) de muestras que se pueden procesar en un único experimento de secuenciación en el Instrumento NovaSeq 6000Dx. Se analizaron doce muestras únicas de ADN de Platinum Genomes (NA12877–NA12888) con al menos 12 combinaciones distintas de cebadores de índices por muestra. Las bibliotecas de muestras se prepararon utilizando un ensayo representativo diseñado para interrogar una serie de genes en 1 970 505 bases en los 23 cromosomas humanos. Los resultados de las muestras de cuatro experimentos de secuenciación utilizando el flujo de trabajo de análisis de la generación de archivos FASTQ y VCF Germline de la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se compararon con la versión 2016-1.0 de Platinum Genomes.

Para el primer grupo de experimentos, se secuenciaron 192 bibliotecas de muestras indexadas de forma única en dos experimentos de secuenciación, con reactivos S2 y S4, para verificar tanto el número máximo de indexaciones admitido como la capacidad del ensayo de realizar de forma sistemática una llamada de genotipo para una muestra dada en combinaciones diferentes de cebadores de índices. Para el segundo conjunto de experimentos, se secuenciaron doce bibliotecas de muestras indexadas de forma única en dos experimentos de secuenciación, con reactivos S2 y S4, con el fin de verificar el número mínimo de indexaciones admitido.

Para los experimentos de 192 índices, el valor PPA de SNV osciló entre el 99,7 % y el 100 %, el valor PPA de inserciones fue del 100 %, el valor PPA de deleciones osciló entre el 96,7 % y el 100 %, y el valor NPA fue del 100 %. Para los experimentos de 12 índices, el valor PPA de SNV osciló entre el 99,7 % y el 100 %, el valor PPA de inserciones osciló entre el 89,6 % y el 100 %, el valor PPA de deleciones osciló entre el 94,6 % y el 100 %, y el valor NPA fue del 100 %.

Arrastre de muestras

El Instrumento NovaSeq 6000Dx permite la secuenciación de varias muestras, así como de los controles en un único experimento de secuenciación. Se realizó un estudio para evaluar el alcance del arrastre de muestras en un experimento de secuenciación (en el experimento) y entre experimentos de secuenciación (entre experimentos). Se analizaron doce muestras de ADN de Platinum Genomes, seis masculinas y seis femeninas, con un ensayo representativo diseñado para buscar una variedad de genes en 1 970 505 bases en los 23 cromosomas humanos, incluidos los cromosomas de ambos sexos. Las bibliotecas se secuenciaron en el Instrumento NovaSeq 6000Dx utilizando el flujo de trabajo de análisis de la generación de archivos FASTQ y VCF Germline de la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. El arrastre de muestras masculinas a muestras femeninas se observó por la presencia de lecturas de cromosoma Y en muestras femeninas.

El arrastre en el experimento puede introducirse durante la generación de grupos, la llamada de bases de ciclos de índices y el demultiplexado de muestras. Para analizar el arrastre de muestras en un experimento de secuenciación, una agrupación de bibliotecas que contenía al menos doce duplicados de cada muestra única

masculina y femenina más dos controles sin cadena molde, con un total de 192 bibliotecas indexadas de forma única, se secuenció en el Instrumento NovaSeq 6000Dx en dos experimentos de secuenciación, con reactivos S2 y S4. El arrastre de muestras en el experimento se evaluó mediante la comparación de la cobertura de cromosoma Y de cada duplicado de muestra femenina con el promedio de cobertura de cromosoma Y de todos los duplicados de muestras masculinas del grupo. El percentil 95 del arrastre observado en el experimento fue del 0,0090 % y del 0,041 % para los reactivos S2 y S4, respectivamente.

Para analizar el arrastre de muestras entre experimentos, se prepararon dos agrupaciones de bibliotecas y se secuenciaron consecutivamente en un Instrumento NovaSeq 6000Dx, con el lado A utilizando reactivos S4 y el lado B utilizando reactivos S2. La primera agrupación contenía al menos doce duplicados de seis muestras femeninas únicas más dos controles sin cadena molde, para un total de 96 bibliotecas indexadas de forma única. La segunda agrupación contenía al menos doce duplicados de seis muestras masculinas únicas más dos controles sin cadena molde, para un total de 96 bibliotecas indexadas de forma única. Ambos grupos emplearon el mismo conjunto de adaptadores de índices. El grupo de muestras femeninas se secuenció primero, seguido de un experimento de secuenciación posterior con el grupo de muestras masculinas. Por último, se repitió otro experimento de secuenciación del grupo de muestras femeninas. El arrastre de muestras entre experimentos se evaluó por tipo de reactivo, S2 y S4, mediante la comparación de la cobertura de cromosoma Y entre los duplicados correspondientes del experimento de repetición del grupo de muestras femeninas y el experimento del grupo de muestras masculinas. El percentil 95 del arrastre observado entre experimentos fue del 0,0089 % y del 0,012 % para los reactivos S2 y S4, respectivamente.

Entrada de ADN

Sangre (Germline [germinal])

Se estableció el rango de entrada de ADN de sangre para el kit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx utilizando la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx para el NovaSeq 6000Dx. Se evaluó llevando a cabo un estudio de dilución en serie con ocho muestras de ADN de Platinum Genomes (NA12877 – NA12884) con un ensayo representativo diseñado para interrogar una serie de genes en 1 970 505 bases en los 23 cromosomas humanos. Las bibliotecas se secuenciaron en un Instrumento NovaSeq 6000Dx utilizando un lote de Kit de reactivos S2 v1.5 para NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) y otro de Kit de reactivos S4 v1.5 para NovaSeq 6000Dx (300 ciclos).

Se analizaron siete muestras por duplicado en seis niveles de entrada de ADN que oscilaban entre 1000 ng y 10 ng (1000 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng y 10 ng). Se analizó una octava muestra (NA12884) como un único duplicado con un nivel de entrada de 10 ng y por duplicado para los restantes niveles de entrada. Para determinar la precisión, los genotipos de muestra se compararon con los de la versión 2016-1.0 de Platinum Genomes. Se establecieron los resultados por cada nivel de entrada. La PPA para cada tipo de variante (SNV, inserciones y deleciones) se presenta en [Resultados PPA para cada entrada de ADN de sangre por tipo de variante en la página 35](#). La NPA se presenta en [NPA para cada entrada de ADN de sangre en la página 35](#). En todos los niveles de entrada se observó una exactitud parecida. La entrada de ADN de sangre recomendada para el Illumina DNA Prep with Enrichment Dx es de 50 ng a 1000 ng, donde los valores 1000 ng y 10 ng indican los límites superior e inferior, respectivamente, para cumplir las características de rendimiento cuando se secuencia en el NovaSeq 6000Dx.

Tabla 9 Resultados PPA para cada entrada de ADN de sangre por tipo de variante

Entrada de ADN (ng)	Tipo de variante	Variantes previstas	TP	FN	Ausencia de llamadas de variante	PPA (%)
10	SNV	69612	69538	68	6	99,9
25		74192	74105	75	12	99,9
50		74105	74	13	99,9	
100		74116	72	4	99,9	
250		74113	72	7	99,9	
1000		74112	73	7	99,9	
10		Inserción	2732	2732	0	0
25	2928		2916	6	6	99,8
50	2914		8	6	99,7	
100	2917		6	5	99,8	
250	2928		0	0	100	
1000	2921		5	2	99,8	
10	Delección		2084	2049	4	31
25		2240	2200	9	31	99,6
50		2207	3	30	99,9	
100		2199	1	40	>99,9	
250		2201	0	39	100	
1000		2195	2	43	99,9	

Tabla 10 NPA para cada entrada de ADN de sangre

Entrada de ADN (ng)	TN	FP	Ausencia de llamadas de referencia	NPA (%)
10	115449045	384	285751	>99,9
25	123012157	415	438153	>99,9
50	122985299	369	465043	>99,9
100	122976660	321	473730	>99,9
250	122971099	331	479289	>99,9
1000	122978527	324	471882	>99,9

FFPE (Somatic [somática])

El rango de entrada de ADN fijado en formol y embebido en parafina (FFPE) para el kit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx utilizando la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se estableció para el NovaSeq 6000Dx. Se evaluó llevando a cabo un estudio de dilución en serie con dos muestras de Platinum Genomes con un ensayo representativo diseñado para interrogar una serie de genes en 1 970 505 bases en los 23 cromosomas humanos. Las bibliotecas se secuenciaron en un Instrumento NovaSeq 6000Dx utilizando un lote de Kit de reactivos S2 v1.5 para NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) y otro de Kit de reactivos S4 v1.5 para NovaSeq 6000Dx (300 ciclos).

El ADN de la muestra GM12877 se diluyó con el ADN de la muestra GM12878 para crear GM12877-13 con variantes heterocigóticas y homocigóticas de GM12877 únicas con frecuencias de variante próximas al 6,5 % y el 13 %, respectivamente. Se analizó también GM12877 sin diluir. Se analizó GM12877-13 por duplicado en cuatro niveles de entrada de ADN que oscilaban entre 1000 ng y 25 ng (1000 ng, 250 ng, 50 ng y 25 ng). Se analizó GM12877 como un único duplicado con un nivel de entrada de 250 ng y por duplicado para los restantes niveles de entrada. Para determinar la exactitud, se compararon llamadas de variantes con la versión 2016-1.0 de Platinum Genomes. Se establecieron los resultados por cada nivel de entrada. La PPA para cada tipo de variante (SNV, inserciones y deleciones) se presenta en [Resultados PPA para cada entrada de ADN FFPE por tipo de variante y VAF de la región de interés en la página 36](#). La NPA se presenta en [NPA para cada entrada de ADN FFPE en la página 37](#). En todos los niveles de entrada se observó una exactitud parecida. Para las muestras FFPE con un valor $\Delta Cq \leq 5$, la entrada de ADN recomendada es de 50 ng a 1000 ng para el kit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, donde los valores 1000 ng y 25 ng indican los límites superior e inferior, respectivamente, para cumplir las características de rendimiento cuando se secuencia en el NovaSeq 6000Dx.

Tabla 11 Resultados PPA para cada entrada de ADN FFPE por tipo de variante y VAF de la región de interés

Entrada de ADN (ng)	Tipo de variante	Variantes previstas	VAF de dilución objetivo								
			0,065					0,13			
			TP	FN	Ausencia de llamadas de variante	PPA (%)	Variantes previstas	TP	FN	Ausencia de llamadas de variante	PPA (%)
25	SNV	3000	2931	8	61	99,7	624	624	0	0	100
50		3000	2930	8	62	99,7	624	622	0	2	100
250		3000	2927	8	65	99,7	624	624	0	0	100
1000		3000	2921	8	71	99,7	624	624	0	0	100
25	Inserción	96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
50		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
250		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
1000		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
25	Delección	88	88	0	0	100	32	32	0	0	100
50		88	88	0	0	100	32	31	0	1	100
250		88	88	0	0	100	32	32	0	0	100
1000		88	88	0	0	100	32	32	0	0	100

Tabla 12 NPA para cada entrada de ADN FFPE

Entrada de ADN (ng)	Estado natural previsto	TN	FP	Ausencia de llamadas de referencia	NPA (%)
25	25354119	25353706	413	5499498	>99,9
50	27538269	27538013	256	3315421	>99,9
250	21562303	21561983	320	1577958	>99,9
1000	29030903	29030596	307	1822781	>99,9

Sensibilidad analítica (Límite del blanco [Limit of Blank, LoB] y Límite de detección [Limit of Detection, LoD])

Este estudio se realizó para evaluar el Límite del blanco (LoB) y el Límite de detección (LoD) para el flujo de trabajo de análisis de la generación de archivos FASTQ y VCF Somatic de la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx en el Instrumento NovaSeq 6000Dx. El estudio se realizó utilizando un ensayo representativo diseñado para interrogar una serie de genes en 1 970 505 bases en los 23 cromosomas humanos. Las estirpes celulares GM12878 y GM12877 de Platinum Genomes se fijaron en formol y embebieron en parafina y, a continuación, se extrajo ADN. Se prepararon diluciones de GM12877 en GM12878 para obtener muestras al 0 %, 4 %, 6,5 % y 13 % de GM12877 por volumen, de modo que las frecuencias de variantes de 489 variantes únicas de GM12877 (454 SNV, 17 inserciones y 18 deleciones) oscilaron entre 0 y 0,13. Se prepararon bibliotecas de muestras utilizando dos lotes de reactivos del kit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx y se secuenciaron durante seis días de inicio consecutivos con dos Instrumento NovaSeq 6000Dx y dos lotes cada uno de Kit de reactivos S2 v1.5 para NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) y Kit de reactivos S4 v1.5 para NovaSeq 6000Dx (300 ciclos), para un total de doce experimentos de secuenciación. El resultado fueron 288 observaciones para cada variante en cada una de las diluciones de muestra. El LoB y el LoD se calcularon usando el enfoque clásico que establece el protocolo CLSI EP17-A2. El LoB y LoB se calcularon por separado para los reactivos S2 y S4 mediante la agrupación de las frecuencias de variantes de todas las variantes en el experimento de secuenciación para cada tipo de reactivo. El error de tipo I se definió como 0,01 y el error de tipo II como 0,05.

El LoB se evaluó independientemente para 489 locus en dos lotes de secuenciación para cada tipo de reactivo (S2 o S4) y preparación de biblioteca. Para los reactivos S2, el percentil 95 de LoB fue del 2,9 %. Para los reactivos S4, el percentil 95 de LoB fue del 2,2 %.

El LoD se calculó con éxito en 478 variantes de un total de 489 para S2 y en 485 variantes de un total de 489 para S4. Las variantes en las que no se determinó el LoD para una o ambas preparaciones de bibliotecas fueron excluidas del LoD final asignado para el sistema NovaSeq 6000Dx. El LoD del sistema NovaSeq 6000Dx con reactivos S2 y S4 se determinó tomando el percentil 95 de los LoD de las variantes individuales. Para los reactivos S2, el percentil 95 de los LoD de las 478 variantes fue del 4,8 %. Para los reactivos S4, el percentil 95 de los LoD de las 485 variantes fue del 3,9 %.

Exactitud

Germline (Línea germinal)

El estudio siguiente se realizó para evaluar la exactitud de la llamada de variantes del flujo de trabajo de análisis de la generación de archivos FASTQ y VCF Germline (germinal) de la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx en el Instrumento NovaSeq 6000Dx utilizando el Kit de reactivos S2 v1.5 para NovaSeq 6000Dx (300 ciclos). Se analizaron cuatro muestras únicas de ADN de Platinum Genomes utilizando un ensayo representativo diseñado para interrogar una serie de genes en 1 970 505 bases (9232 regiones de interés) en los 23 cromosomas humanos. Cada una de las muestras se analizó en duplicados de 12, excepto NA12880, que se analizó en duplicados de 11. Se llevaron a cabo un total de 18 experimentos con tres instrumentos de secuenciación, tres lotes de reactivos S2 y dos operadores durante seis días de inicio. Se determinó la exactitud de las SNV, las inserciones y las deleciones mediante la comparación de los resultados con la versión 2016-1.0 de Platinum Genomes.

Tabla 13 Resumen de la coincidencia de Germline (germinal)

Criterios	Total de observaciones ¹	Resultado de observación ²	Resultado por experimento ³
PPA de SNV	846	99,8	99,9
PPA de inserciones	846	97,9	>99,9
PPA de deleciones	846	96,9	99,9
NPA	846	>99,9	>99,9
OPA	846	>99,9	>99,9

¹Calculado de la siguiente manera: número de muestras por experimento (47) × número de experimentos (18) = 846.

²Valor observado más bajo por duplicado de muestra en los 18 experimentos en total.

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

Coincidencia de Germline (germinal) por muestra en la página 39 contiene los datos del estudio donde se presentan las coincidencias de porcentaje positivo y negativo por muestra, en los que los resultados de las variantes se comparan con la versión 2016-1.0 de Platinum Genomes para llevar a cabo los cálculos de PPA. Se combinan los tres tipos de variantes (SNV, inserciones y deleciones). Dado que el método de referencia solo proporciona resultados de las variantes de nucleótido único y de las inserciones/deleciones, los resultados de la base sin variantes se comparan con el conjunto hg19 de la secuencia de referencia del genoma humano para los cálculos de la NPA.

Tabla 14 Coincidencia de Germline (germinal) por muestra

Muestra	Capacidad de llamada de autosomas	Variantes previstas ¹	TP	FN	Ausencia de llamadas de variante	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	99,4	273672	273452	220	0	414765131	931	99,9	>99,9	>99,9
NA12878	99,4	265680	265208	234	238	414803691	1193	99,9	>99,9	>99,9
NA12879	99,4	261792	261792	0	0	414746986	1429	100	>99,9	>99,9
NA12880	99,4	246114	245551	399	164	380157538	1458	99,8	>99,9	>99,9

¹ Número total de variantes en todos los duplicados de muestras en los 18 experimentos.

Coincidencia de Germline (germinal) por muestra y tipo de variante en la página 39 contiene los datos del estudio presentados por muestra, en los que los resultados de las variantes se comparan con el método de referencia compuesto y con características bien definidas. La detección de cada tipo de variante se evalúa de forma independiente: SNV, inserciones y deleciones. Se excluyen las posiciones de referencia.

Tabla 15 Coincidencia de Germline (germinal) por muestra y tipo de variante

Muestra	SVN			Inserciones			Deleciones		
	Previsto	TP	FN	Previsto	TP	FN	Previsto	TP	FN
NA12877	255096	254877	219	10368	10367	1	8208	8208	0
NA12878	250344	250077	221	8424	8424	0	6912	6707	13
NA12879	246024	246024	0	8856	8856	0	6912	6912	0
NA12880	229482	229086	396	9306	9306	0	7326	7159	3

Las muestras se analizaron con una mayor profundidad para hacer llamadas a inserciones y deleciones de menor tamaño (indels). Se ofrece un resumen general en *Resumen de la detección de indel de Germline (germinal) en la página 40*. Se detectó un total de 210 indels cuyo tamaño oscilaba entre 1 y 18 pb en el caso de las inserciones y entre 1 y 21 pb en el caso de las deleciones.

Tabla 16 Resumen de la detección de indel de Germline (germinal)

Tipo de variante	Variantes previstas	TP	FN	Ausencia de llamadas de variante	PPA
Inserción	36954	36953	1	0	>99,9
Delección	29358	28986	16	356	99,9

El ensayo representativo incluía 9232 regiones de interés que cubrían un contenido genómico diverso. El contenido de GC de las regiones de interés oscilaba entre 0,20 y 0,86. Las regiones de interés también contenían una serie de repeticiones de nucleótido único (por ejemplo, poli-A y poli-T), dinucleótido y trinucleótido. Los datos compilados por cromosoma para determinar el efecto del contenido genómico sobre el porcentaje de llamadas correctas se presentan en [Exactitud a nivel de cromosoma de Germline en la página 40](#). El porcentaje de llamadas correctas contiene las llamadas de variantes y de referencia y se sitúa por debajo del 100 % si se producen llamadas incorrectas o ausencia de llamadas.

Tabla 17 Exactitud a nivel de cromosoma de Germline

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr1	47	728	138328	Poli-A (12), Poli-C (7), Poli-T (14), Poli-G (7), Dinucleótido (22), Trinucleótido (8), Inserción (18), Delección (4)	[0,22 - 0,8]; Mediana: 0,51	114888718	34	966860	>99,9	0,83

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr2	39	628	159588	Poli-A (46), Poli-C (8), Poli-T (23), Poli-G (7), Dinucleótido (22), Trinucleótido (8), Inserción (5), Delección (2)	[0,24 - 0,81]; Mediana: 0,44	132293464	798	460345	>99,9	0,35
chr3	38	650	137627	Poli-A (18), Poli-C (6), Poli-T (18), Poli-G (7), Dinucleótido (12), Trinucleótido (6), Inserción (11), Delección (1)	[0,25 - 0,86]; Mediana: 0,45	114625053	2	226461	>99,9	0,20

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr4	17	370	73766	Poli-A (9), Poli-C (7), Poli-T (25), Poli-G (6), Dinucleótido (5), Trinucleótido (5), Inserción (2), Delección (2)	[0,27 - 0,77]; Mediana: 0,45	61872303	0	66741	100	0,11
chr5	25	507	90008	Poli-A (10), Poli-C (6), Poli-T (12), Poli-G (7), Dinucleótido (10), Trinucleótido (8), Inserción (8), Delección (18)	[0,29 - 0,79]; Mediana: 0,46	75314497	912	153061	>99,9	0,20

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr6	39	453	126721	Poli-A (28), Poli-C (7), Poli-T (33), Poli-G (7), Dinucleótido (18), Trinucleótido (11), Inserción (4), Deleción (2)	[0,24 - 0,79]; Mediana: 0,48	103412695	1	182361	>99,9	0,18
chr7	21	450	161501	Poli-A (27), Poli-C (8), Poli-T (21), Poli-G (7), Dinucleótido (31), Trinucleótido (5), Inserción (1), Deleción (4)	[0,2 - 0,77]; Mediana: 0,46	132534074	19	246884	>99,9	0,19

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr8	18	381	67775	Poli-A (19), Poli-C (7), Poli-T (13), Poli-G (7), Dinucleótido (5), Trinucleótido (9), Inserción (4), Delección (1)	[0,26 - 0,78]; Mediana: 0,47	56247612	411	170925	>99,9	0,30
chr9	23	347	87100	Poli-A (12), Poli-C (7), Poli-T (27), Poli-G (8), Dinucleótido (9), Trinucleótido (9), Inserción (4), Delección (1)	[0,27 - 0,83]; Mediana: 0,49	72650800	20	241991	>99,9	0,33

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr10	14	317	66723	Poli-A (26), Poli-C (7), Poli-T (15), Poli-G (6), Dinucleótido (16), Trinucleótido (6), Inserción (1), Delección (1)	[0,23 - 0,78]; Mediana: 0,44	55539058	1	188216	>99,9	0,34
chr11	29	511	91786	Poli-A (28), Poli-C (8), Poli-T (21), Poli-G (7), Dinucleótido (26), Trinucleótido (7), Inserción (2), Delección (2)	[0,28 - 0,8]; Mediana: 0,47	75744222	742	259258	>99,9	0,34

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr12	29	577	120365	Poli-A (19), Poli-C (8), Poli-T (40), Poli-G (7), Dinucleótido (7), Trinucleótido (7), Inserción (1), Deleción (5)	[0,26 - 0,77]; Mediana: 0,49	99972530	1	542005	>99,9	0,54
chr13	13	283	58639	Poli-A (24), Poli-C (6), Poli-T (12), Poli-G (7), Dinucleótido (6), Trinucleótido (8), Inserción (14), Deleción (0)	[0,28 - 0,79]; Mediana: 0,42	48503179	1	45666	>99,9	0,09

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr14	11	147	26980	Poli-A (21), Poli-C (6), Poli-T (18), Poli-G (11), Dinucleótido (6), Trinucleótido (6), Inserción (4), Deleción (1)	[0,29 - 0,77]; Mediana: 0,47	22286153	198	147895	>99,9	0,66
chr15	15	266	52091	Poli-A (26), Poli-C (7), Poli-T (13), Poli-G (6), Trinucleótido (8), Inserción (4), Deleción (6)	[0,29 - 0,76]; Mediana: 0,46	43600279	0	99041	100	0,23
chr16	21	366	80030	Poli-A (7), Poli-C (7), Poli-T (15), Poli-G (7), Dinucleótido (5), Trinucleótido (10), Inserción (15), Deleción (21)	[0,3 - 0,76]; Mediana: 0,54	65490245	16	1438278	>99,9	2,15

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr17	36	645	118062	Poli-A (19), Poli-C (7), Poli-T (18), Poli-G (8), Dinucleótido (13), Trinucleótido (6), Inserción (18), Deleción (16)	[0,28 - 0,82]; Mediana: 0,49	97929929	417	335905	>99,9	0,34
chr18	9	99	19195	Poli-A (7), Poli-C (7), Poli-T (15), Poli-G (6), Trinucleótido (10), Inserción (4), Deleción (0)	[0,22 - 0,78]; Mediana: 0,44	15967171	312	42077	>99,9	0,26
chr19	30	605	104004	Poli-A (19), Poli-C (7), Poli-T (31), Poli-G (7), Dinucleótido (5), Trinucleótido (7), Inserción (2), Deleción (21)	[0,33 - 0,83]; Mediana: 0,59	85642066	3	678213	>99,9	0,79

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr20	12	179	33795	Poli-A (6), Poli-C (6), Poli-T (7), Poli-G (8), Trinucleótido (9), Inserción (5), Delección (0)	[0,31 - 0,84]; Mediana: 0,53	28108712	0	38374	100	0,14
chr21	5	63	30642	Poli-A (28), Poli-C (6), Poli-T (24), Poli-G (7), Dinucleótido (5), Inserción (2), Delección (5)	[0,22 - 0,78]; Mediana: 0,52	25319736	50	57434	>99,9	0,23
chr22	10	187	36727	Poli-A (26), Poli-C (7), Poli-T (19), Poli-G (7), Dinucleótido (5), Trinucleótido (6), Inserción (6), Delección (0)	[0,27 - 0,74]; Mediana: 0,51	30258131	0	42673	100	0,14

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chrX	23	433	83576	Poli-A (18), Poli-C (8), Poli-T (23), Poli-G (9), Dinucleótido (5), Trinucleótido (23), Inserción (3), Delección (0)	[0,2 - 0,72]; Mediana: 0,48	67318722	0	770544	100	1,13
chrY	0	40	5476	Poli-A (11), Poli-C (8), Poli-T (11), Poli-G (5), Inserción (0), Delección (0)	[0,4 - 0,59]; Mediana: 0,45	0	0	0	N/D	N/D

Los resultados de la secuenciación de la muestra NA12878 se compararon con un genotipo muy fiable definido para la NA12878 por el Instituto Nacional de Normas y Tecnología (NIST, National Institute of Standards and Technology) de EE. UU. (v.2.19). De las 9232 regiones de interés, 8009 estaban incluidas completamente en las regiones genómicas muy fiables, 776 regiones de interés coincidían parcialmente y 447 no coincidían en absoluto con la secuencia del NIST. El resultado fueron 1 831 483 coordenadas por duplicado para llevar a cabo la comparación. Las llamadas de bases de no variantes se compararon con el conjunto hg19 de la secuencia de referencia del genoma humano. Los resultados de exactitud se muestran en [Coincidencia de Germline \(germinal\) de la muestra NA12878 con la base de datos del NIST en la página 50](#).

Tabla 18 Coincidencia de Germline (germinal) de la muestra NA12878 con la base de datos del NIST

Muestra	N.º de regiones de interés cubiertas	Capacidad de llamada de autosomas	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	8785	99,4	247709	218	394262149	4584	>99,9	>99,9	>99,9

Según los datos proporcionados por este estudio de Germline (germinal) de 18 experimentos, el Instrumento NovaSeq 6000Dx puede secuenciar de forma sistemática:

- Contenido de GC ≥ 20 % (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 1692 regiones de interés secuenciadas con el 20 % de contenido de GC y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0 %)
- Contenido de GC ≤ 86 % (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 846 regiones de interés secuenciadas con el 86 % de contenido de GC y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0 %)
- Longitudes de poli-A ≤ 46 (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 846 regiones de interés secuenciadas con una repetición de poli-A de 46 nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,27 %)
- Longitudes de poli-T ≤ 40 (se llamaron correctamente 13 384 074 bases de un total de 13 384 321 bases llamadas de 846 regiones de interés secuenciadas con una repetición de poli-T de 40 nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,26 %)
- Longitudes de poli-G ≤ 11 (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 846 regiones de interés secuenciadas con una repetición de poli-G de 11 nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0 %)
- Longitudes de poli-C ≤ 8 (se llamaron correctamente 9 815 030 bases de un total de 9 815 035 bases llamadas de 5922 regiones de interés secuenciadas con una repetición de poli-C de 8 nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,53 %)
- Longitudes de repetición de dinucleótido $\leq 31\times$ (se llamaron correctamente 32 233 922 bases de un total de 32 233 926 bases llamadas de 846 regiones de interés secuenciadas con repetición de dinucleótido de 31 y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,21 %)
- Longitudes de repetición de trinucleótido $\leq 23\times$ (se llamaron correctamente todas las bases de 846 regiones de interés secuenciadas con repetición de trinucleótido de 23 y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,21 %)
- Longitudes de inserción ≤ 18 (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 1692 regiones de interés secuenciadas con una inserción de 18 nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 7,71 %)
- Longitudes de delección ≤ 21 (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 1692 regiones de interés secuenciadas con una delección de 21 nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 1,14 %)

Somático

El estudio aquí descrito se utilizó para evaluar la exactitud de la llamada de variantes del flujo de trabajo de análisis de la generación de archivos FASTQ y VCF Somatic de la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx en el Instrumento NovaSeq 6000Dx utilizando el Kit de reactivos S4 v1.5 para NovaSeq 6000Dx (300 ciclos).

En este estudio se empleó un ensayo representativo diseñado para interrogar una serie de genes en 1 970 505 bases (9232 regiones de interés) en los 23 cromosomas humanos. El ADN de Platinum Genomes se extrajo de bloques modificados con FFPE para generar cuatro 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 GM12877-13 con variantes heterocigóticas y homocigóticas de GM12877 únicas con frecuencias de variante próximas al 6,5 % y el 13 %, respectivamente. El ADN de la muestra GM12878 se diluyó de forma similar con el ADN de la muestra GM12877 para crear GM12878-13 con variantes heterocigóticas y homocigóticas de GM12878 únicas con frecuencias de variante próximas al 6,5 % y el 13 %, respectivamente. Se analizaron también GM12877 y GM12878 sin diluir. Cada una de las muestras se analizó en duplicados de 12, excepto GM12878 sin diluir, que se analizó en duplicados de 11. Se llevaron a cabo un total de 18 experimentos con tres instrumentos de secuenciación, tres lotes de reactivos S4 y dos operadores durante seis días de inicio. Se determinó la exactitud de las SNV, las inserciones y las deleciones mediante la comparación de los resultados con la versión 2016-1.0 de Platinum Genomes.

Tabla 19 Resumen de la coincidencia de Somatic (somática)

Criterios	N.º de observaciones ¹	Resultado de las observaciones ²	Resultado por experimento ³
PPA de SNV Somatic	846	99,8	98,9
PPA de inserciones Somatic	846	100	100
PPA de deleciones Somatic	846	100	100
NPA	846	>99,9	>99,9
OPA	846	>99,9	>99,9

¹ Calculado como N.º de muestras por experimento (47) × N.º de experimentos (18) = 846.

² Valor observado más bajo por duplicado de muestra en los 18 experimentos en total.

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

Coincidencia de Somatic (somática) por muestra en la página 53 contiene los datos del estudio donde se presentan las coincidencias de porcentaje positivo y negativo por muestra, en las que los resultados de las variantes se comparan con el método de referencia compuesto y con características bien definidas que se utiliza para llevar a cabo los cálculos de la PPA. Se combinan los tres tipos de variantes (SNV, inserciones y deleciones). Dado que el método de referencia solo proporciona resultados de las variantes de nucleótido único y de las inserciones/deleciones, los resultados de la base sin variantes se comparan con el conjunto hg19 de la secuencia de referencia del genoma humano para los cálculos de la NPA.

Tabla 20 Coincidencia de Somatic (somática) por muestra

Muestra	Capacidad de llamada de autosomas	Variantes previstas	TP	FN	Ausencia de llamadas de variante	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	95,4	96228	95022	198	1008	365425810	1203	99,8	>99,9	>99,9
GM12878	94,5	96768	96278	0	490	395002023	1278	100	>99,9	>99,9
GM12877-13	94,7	104976	103029	216	1731	395989324	1286	99,8	>99,9	>99,9
GM12878-13	95,2	96768	96027	0	741	397900884	1218	100	>99,9	>99,9

Coincidencia de Somatic (somática) por muestra y tipo de variante en la página 53 engloba los datos del estudio presentados por muestra, en los que los resultados de las variantes se comparan con el método de referencia compuesto y con características bien definidas. La detección de cada tipo de variante se evalúa de forma independiente: SNV, inserciones y deleciones. Se excluyen las posiciones de referencia.

Tabla 21 Coincidencia de Somatic (somática) por muestra y tipo de variante

Muestra	SNV			Inserciones			Deleciones		
	Previsto	TP	FN	Previsto	TP	FN	Previsto	TP	FN
GM12877	89694	88488	198	3564	3564	0	2970	2970	0
GM12878	92664	92390	0	2160	2160	0	1944	1728	0
GM12877-13	97848	95901	216	3888	3888	0	3240	3240	0
GM12878-13	92664	92139	0	2160	2160	0	1944	1728	0

Las cuatro muestras se analizaron con una mayor profundidad para hacer llamadas a inserciones y deleciones de menor tamaño (indels). Se ofrece un resumen general en *Resumen de la detección de indel de Somatic (somática) en la página 54*. Se detectó un total de 210 indels cuyo tamaño oscilaba entre 1 y 18 pb en el caso de las inserciones y entre 1 y 21 pb en el caso de las deleciones.

Tabla 22 Resumen de la detección de indel de Somatic (somática)

Tipo de variante	Variantes previstas	TP	FN	Ausencia de llamadas de variante	PPA
Inserción	11772	11772	0	0	100
Delección	10098	9666	0	432	100

El ensayo representativo incluía 9232 regiones de interés que cubrían un contenido genómico diverso. El contenido de GC de las regiones de interés osciló entre 0,20 y 0,86. Las regiones de interés también contenían una serie de repeticiones de nucleótido único (por ejemplo, poli-A y poli-T), dinucleótido y trinucleótido. Los datos compilados por cromosoma para determinar el efecto del contenido genómico sobre el porcentaje de llamadas correctas se presentan en [Exactitud a nivel de cromosoma de Somatic en la página 54](#). El porcentaje de llamadas correctas contiene las llamadas de variantes y de referencia y se sitúa por debajo del 100 % si se producen llamadas incorrectas o ausencia de llamadas.

Tabla 23 Exactitud a nivel de cromosoma de Somatic

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr1	47	728	138328	Poli-A (12), Poli-C (7), Poli-T (14), Poli-G (7), Dinucleótido (22), Trinucleótido (8), Inserción (3), Delección (0)	[0,22 - 0,8]; Mediana: 0,51	110145939	52	5642613	>99,9	4,9

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr2	39	628	159588	Poli-A (46), Poli-C (8), Poli-T (23), Poli-G (7), Dinucleótido (22), Trinucleótido (8), Inserción (5), Deleción (1)	[0,24 - 0,81]; Mediana: 0,44	126795713	842	5850393	>99,9	4,4
chr3	38	650	137627	Poli-A (18), Poli-C (6), Poli-T (18), Poli-G (7), Dinucleótido (12), Trinucleótido (6), Inserción (1), Deleción (1)	[0,25 - 0,86]; Mediana: 0,45	109902527	593	4889226	>99,9	4,3

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr4	17	370	73766	Poli-A (9), Poli-C (7), Poli-T (25), Poli-G (6), Dinucleótido (5), Trinucleótido (5), Inserción (0), Delección (1)	[0,27 - 0,77]; Mediana: 0,45	59373461	16	2517412	>99,9	4,1
chr5	25	507	90008	Poli-A (10), Poli-C (6), Poli-T (12), Poli-G (7), Dinucleótido (10), Trinucleótido (8), Inserción (8), Delección (18)	[0,29 - 0,79]; Mediana: 0,46	72261191	723	3116981	>99,9	4,1

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr6	39	453	126721	Poli-A (28), Poli-C (7), Poli-T (33), Poli-G (7), Dinucleótido (18), Trinucleótido (11), Inserción (0), Deleción (1)	[0,24 - 0,79]; Mediana: 0,48	98593101	687	4890221	>99,9	4,7
chr7	21	450	161501	Poli-A (27), Poli-C (8), Poli-T (21), Poli-G (7), Dinucleótido (31), Trinucleótido (5), Inserción (1), Deleción (4)	[0,2 - 0,77]; Mediana: 0,46	126913574	104	5773856	>99,9	4,4

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr8	18	381	67775	Poli-A (19), Poli-C (7), Poli-T (13), Poli-G (7), Dinucleótido (5), Trinucleótido (9), Inserción (4), Deleción (0)	[0,26 - 0,78]; Mediana: 0,47	53430489	175	2958909	>99,9	5,2
chr9	23	347	87100	Poli-A (12), Poli-C (7), Poli-T (27), Poli-G (8), Dinucleótido (9), Trinucleótido (9), Inserción (0), Deleción (1)	[0,27 - 0,83]; Mediana: 0,49	69594586	74	3260257	>99,9	4,5

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr10	14	317	66723	Poli-A (26), Poli-C (7), Poli-T (15), Poli-G (6), Dinucleótido (16), Trinucleótido (6), Inserción (0), Delección (0)	[0,23 - 0,78]; Mediana: 0,44	53209592	90	2469444	>99,9	4,4
chr11	29	511	91786	Poli-A (28), Poli-C (8), Poli-T (21), Poli-G (7), Dinucleótido (26), Trinucleótido (7), Inserción (2), Delección (2)	[0,28 - 0,8]; Mediana: 0,47	72291795	150	3665560	>99,9	4,8

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr12	29	577	120365	Poli-A (19), Poli-C (8), Poli-T (40), Poli-G (7), Dinucleótido (7), Trinucleótido (7), Inserción (0), Delección (3)	[0,26 - 0,77]; Mediana: 0,49	96109352	101	4331932	>99,9	4,3
chr13	13	283	58639	Poli-A (24), Poli-C (6), Poli-T (12), Poli-G (7), Dinucleótido (6), Trinucleótido (8), Inserción (14), Delección (0)	[0,28 - 0,79]; Mediana: 0,42	46130028	44	2384839	>99,9	4,9

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr14	11	147	26980	Poli-A (21), Poli-C (6), Poli-T (18), Poli-G (11), Dinucleótido (6), Trinucleótido (6), Inserción (4), Deleción (0)	[0,29 - 0,77]; Mediana: 0,47	21336891	0	1078329	100	4,8
chr15	15	266	52091	Poli-A (26), Poli-C (7), Poli-T (13), Poli-G (6), Trinucleótido (8), Inserción (4), Deleción (0)	[0,29 - 0,76]; Mediana: 0,46	41918631	184	1753300	>99,9	4,0
chr16	21	366	80030	Poli-A (7), Poli-C (7), Poli-T (15), Poli-G (7), Dinucleótido (5), Trinucleótido (10), Inserción (15), Deleción (21)	[0,3 - 0,76]; Mediana: 0,54	62344351	18	4540539	>99,9	6,8

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr17	36	645	118062	Poli-A (19), Poli-C (7), Poli-T (18), Poli-G (8), Dinucleótido (13), Trinucleótido (6), Inserción (18), Deleción (1)	[0,28 - 0,82]; Mediana: 0,49	93811318	414	4403622	>99,9	4,5
chr18	9	99	19195	Poli-A (7), Poli-C (7), Poli-T (15), Poli-G (6), Trinucleótido (10), Inserción (0), Deleción (0)	[0,22 - 0,78]; Mediana: 0,44	15007653	6	990633	>99,9	6,2
chr19	30	605	104004	Poli-A (19), Poli-C (7), Poli-T (31), Poli-G (7), Dinucleótido (5), Trinucleótido (7), Inserción (2), Deleción (3)	[0,33 - 0,83]; Mediana: 0,59	81416722	455	4860311	>99,9	5,6

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chr20	12	179	33795	Poli-A (6), Poli-C (6), Poli-T (7), Poli-G (8), Trinucleótido (9), Inserción (5), Delección (0)	[0,31 - 0,84]; Mediana: 0,53	26833936	7	1301905	>99,9	4,6
chr21	5	63	30642	Poli-A (28), Poli-C (6), Poli-T (24), Poli-G (7), Dinucleótido (5), Inserción (1), Delección (0)	[0,22 - 0,78]; Mediana: 0,52	24169250	44	1172087	>99,9	4,6
chr22	10	187	36727	Poli-A (26), Poli-C (7), Poli-T (19), Poli-G (7), Dinucleótido (5), Trinucleótido (6), Inserción (6), Delección (0)	[0,27 - 0,74]; Mediana: 0,51	28887217	86	1392179	>99,9	4,6

Cromosoma	N.º de genes	N.º de regiones de interés	N.º de bases	Contenido genómico	Intervalo GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas	% de ausencias de llamadas
chrX	23	433	83576	Poli-A (18), Poli-C (8), Poli-T (23), Poli-G (9), Dinucleótido (5), Trinucleótido (23), Inserción (3), Delección (0)	[0,2 - 0,72]; Mediana: 0,48	64231080	241	3852253	>99,9	5,7
chrY	0	40	5476	Poli-A (11), Poli-C (8), Poli-T (11), Poli-G (5), Inserción (0), Delección (0)	[0,4 - 0,59]; Mediana: 0,45	0	0	0	N/D	N/D

Los resultados de la secuenciación de la muestra GM12878 se compararon con un genotipo muy fiable establecido para la NA12878 por el Instituto Nacional de Normas y Tecnología (NIST) (v.2.19). De las 9232 regiones de interés, 8009 estaban incluidas completamente en las regiones genómicas muy fiables, 776 regiones de interés coincidían parcialmente y 447 no coincidían en absoluto con la secuencia del NIST. El resultado fueron 1 831 483 coordenadas por duplicado para llevar a cabo la comparación. Las llamadas de bases de no variantes se compararon con el conjunto hg19 de la secuencia de referencia del genoma humano. Los resultados de exactitud se muestran en [Coincidencia de Somatic \(somática\) de la muestra GM12878 con la base de datos del NIST en la página 64](#).

Tabla 24 Coincidencia de Somatic (somática) de la muestra GM12878 con la base de datos del NIST

Muestra	N.º de regiones de interés cubiertas	Capacidad de llamada de autosomas	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	8785	94,5	247228	0	375073821	2043	100	>99,9	>99,9

Según los datos proporcionados por este estudio de Somatic (somática) de 18 experimentos, el Instrumento NovaSeq 6000Dx puede secuenciar de forma sistemática:

- Contenido de GC ≥ 20 % (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 1692 regiones de interés secuenciadas con el 20 % de contenido de GC y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,34 %)
- Contenido de GC ≤ 86 % (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 846 regiones de interés secuenciadas con el 86 % de contenido de GC y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 4,21 %)
- Longitudes de poli-A ≤ 46 (se llamaron correctamente 14 550 082 bases de un total de 14 550 083 bases llamadas de 846 regiones de interés secuenciadas con una repetición de poli-A de 46 nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 4,18 %)
- Longitudes de poli-T ≤ 40 (se llamaron correctamente 12 833 489 bases de un total de 12 833 491 bases llamadas de 846 regiones de interés secuenciadas con una repetición de poli-T de 40 nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 4,37 %)
- Longitudes de poli-G ≤ 11 (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 846 regiones de interés secuenciadas con una repetición de poli-G de 11 nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 7,59 %)
- Longitudes de poli-C ≤ 8 (se llamaron correctamente 9 405 604 bases de un total de 9 405 615 bases llamadas de 5922 regiones de interés secuenciadas con una repetición de poli-C de 8 nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 4,68 %)
- Longitudes de repetición de dinucleótido $\leq 31\times$ (se llamaron correctamente 30 996 684 bases de un total de 30 996 712 bases llamadas de 846 regiones de interés secuenciadas con repetición de dinucleótido de 31 y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 4,04 %)
- Longitudes de repetición de trinucleótido $\leq 23\times$ (se llamaron correctamente todas las bases de 846 regiones de interés secuenciadas con repetición de trinucleótido de 23 y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 5,39 %)
- Longitudes de inserción ≤ 18 (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 846 regiones de interés secuenciadas con una inserción de 18 nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 1,44 %)
- Longitudes de delección ≤ 21 (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 846 regiones de interés secuenciadas con una delección de 21 nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 7,86 %)

Precisión

La precisión del Instrumento NovaSeq 6000Dx se evaluó usando muestras de Platinum Genomes con un ensayo representativo diseñado para buscar una variedad de genes en 1 970 505 bases de 23 cromosomas diferentes utilizando 9232 oligonucleótidos de interés. Se evaluaron un total de 1723 variantes pequeñas de interés (SNV, inserciones y deleciones). Las pruebas de Germline (germinal) se componían de once o doce duplicados de cuatro muestras únicas de Platinum Genomes. Las pruebas de Somatic (somática) se componían de once o doce duplicados de cuatro muestras únicas tratadas con FFPE de Platinum Genomes a diferentes niveles de VAF. Las bibliotecas de muestras se prepararon utilizando reactivos del kit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

El análisis se realizó en un centro interno con tres Instrumento NovaSeq 6000Dx, con tres lotes de Kit de reactivos S2 v1.5 para NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) y Kit de reactivos S4 v1.5 para NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) cada uno y dos operadores durante seis días de inicio. Para cada día de inicio, se secuenciaron bibliotecas de muestras Germline (germinal) en un lado del instrumento utilizando reactivos S2 y el flujo de trabajo de análisis de la generación de archivos FASTQ y VCF Germline de la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, y se secuenciaron bibliotecas de muestras Somatic (somática) en el otro lado del instrumento utilizando reactivos S4 y el flujo de trabajo de análisis de la generación de archivos FASTQ y VCF Somatic de la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. El resultado fueron 18 celdas de flujo para cada flujo de trabajo de Germline (germinal) y Somatic (somática).

Germline (Línea germinal)

En los experimentos Germline (germinal), las ubicaciones genómicas en las que se detecta una variante germinal de interés se notifican como positivas. Para las variantes germinales positivas previstas, se evaluaron los datos del índice de ausencia de llamada y del porcentaje de llamadas positivas (PPC) en cada tipo de variante (SNV, inserción y deleción). [Precisión dentro de un mismo laboratorio de las observaciones de llamadas de variantes germinales para los resultados positivos previstos por tipo de variante en la página 66](#) resume los índices observados, junto con los niveles de confianza superior e inferior (LCL/UCL) al 95 % calculados con el método Wilson para cada tipo de variante.

Tabla 25 Precisión dentro de un mismo laboratorio de las observaciones de llamadas de variantes germinales para los resultados positivos previstos por tipo de variante

Tipo de variante	Ausencia de llamadas observada ¹	Llamadas totales	Porcentaje de ausencia de llamadas	Llamadas positivas observadas ²	Llamadas evaluables totales	PPC	LCL al 95 % ³	UCL al 95 %
SNV	6	980316	<0,01	979854	980310	99,95	99,95	99,96
Inserción	0	36738	0	36738	36738	100	>99,99	100
Deleción	18	34434	0,05	32160	34416	93,44	93,18	93,70

¹ Ausencia de llamadas se define como una posición cromosómica de interés en la que no puede determinarse una variante (debido a una baja profundidad de cobertura).

² Llamada positiva se define como posiciones cromosómicas de interés en las que se detecta una variante.

³ Intervalos de confianza bilateral del 95 % calculados utilizando el método de puntuación de Wilson.

Las ubicaciones genómicas en las que no se detecta una variante de interés se notifican como negativas (en estado natural). Para las variantes negativas previstas, se evaluaron los datos del índice de ausencia de llamadas y del porcentaje de llamadas negativas (PNC). [Precisión dentro de un mismo laboratorio de las observaciones de llamadas de variantes germinales para los resultados negativos previstos en la página 67](#) resume los índices observados, junto con los niveles de confianza superior e inferior (LCL/UCL) al 95 % calculados con el método Wilson.

Tabla 26 Precisión dentro de un mismo laboratorio de las observaciones de llamadas de variantes germinales para los resultados negativos previstos

Tipo de variante	Ausencia de llamadas observada ¹	Llamadas totales	Porcentaje de ausencia de llamadas	Llamadas negativas observadas ²	Llamadas evaluables totales	PNC	LCL al 95 % ³	UCL al 95 %
Estado natural	0	406170	0	406170	406170	100	>99,99	100

¹ Ausencia de llamadas se define como una posición cromosómica de interés en la que no puede determinarse una variante (debido a una baja profundidad de cobertura).

² Llamada negativa se define como posiciones cromosómicas de interés en las que no se detecta una variante.

³ Intervalos de confianza bilateral del 95 % calculados utilizando el método de puntuación de Wilson.

La contribución de cada parámetro (instrumento, lote de reactivo, día, duplicado de biblioteca) a la variabilidad global se determinó mediante el análisis de los componentes de varianza utilizando la frecuencia de variantes como la variable de respuesta. La media de la desviación estándar global fue de 0,0370. Los principales contribuyentes a la variabilidad de la frecuencia de variantes fueron los duplicados de la preparación de bibliotecas, que contribuyeron el 17,1 % de la variabilidad global. El día contribuyó el 1 %, mientras que el instrumento y el lote de reactivos contribuyeron cada uno con menos del 1 % de la variabilidad total [Precisión dentro de un mismo laboratorio de las estimaciones de los componentes de la varianza para las frecuencias de variantes de las muestras Germline \(germinal\) en la página 67](#) (SD = desviación estándar).

Tabla 27 Precisión dentro de un mismo laboratorio de las estimaciones de los componentes de la varianza para las frecuencias de variantes de las muestras Germline (germinal)

Componente	SD media	% medio de la SD total
Día	0,0020	1,028
Instrumento	0,0018	0,837
Lote de consumibles	0,0016	0,712
Duplicado de bibliotecas	0,0143	17,110
Total	0,0370	100

Somático

En los experimentos Somatic (somática), las ubicaciones genómicas en las que se detecta una variante somática de interés se notifican como positivas (variante). Para las muestras diluidas GM12877-13 y GM12878-13 con variantes somáticas positivas previstas y VAF entre 6,5 % y 13 %, se evaluaron los datos del índice de ausencia de llamadas y del porcentaje de llamadas positivas (PPC) en cada tipo de variante (SNV, inserción y deleción). [Precisión dentro de un mismo laboratorio de las observaciones de llamadas de variantes somáticas para los resultados positivos previstos por tipo de variante \(VAF media es \$\geq 6,5\$ % y \$\leq 13\$ %\) en la página 68](#) resume los índices observados, junto con los niveles de confianza superior e inferior (LCL/UCL) al 95 % calculados con el método Wilson para cada tipo de variante.

Tabla 28 Precisión dentro de un mismo laboratorio de las observaciones de llamadas de variantes somáticas para los resultados positivos previstos por tipo de variante (VAF media es $\geq 6,5$ % y ≤ 13 %)

Tipo de variante	Ausencia de llamadas observada ¹	Llamadas totales	Porcentaje de ausencia de llamadas	Llamadas positivas observadas ²	Llamadas evaluables totales	PPC	LCL al 95 % ³	UCL al 95 %
SNV	0	96939	0	96069	96939	99,10	99,04	99,16
Inserción	0	3004	0	3004	3004	100	99,87	100
Deleción	0	2912	0	2907	2912	99,83	99,60	99,93

¹ Ausencia de llamadas se define como una posición cromosómica de interés en la que no puede determinarse una variante (debido a una baja profundidad de cobertura).

² Llamada positiva se define como posiciones cromosómicas de interés en las que se detecta una variante.

³ Intervalos de confianza bilateral del 95 % calculados utilizando el método de puntuación de Wilson.

Las ubicaciones genómicas en las que no se detecta una variante somática de interés se notifican como negativas (en estado natural). Para las ubicaciones negativas previstas, se evaluaron los datos del índice de ausencia de llamadas y del porcentaje de llamadas negativas. [Precisión dentro de un mismo laboratorio de las observaciones de llamadas de variantes somáticas para los resultados negativos previstos en la página 68](#) resume los índices observados, junto con los niveles de confianza superior e inferior (LCL/UCL) al 95 % calculados con el método Wilson para cada tipo de variante.

Tabla 29 Precisión dentro de un mismo laboratorio de las observaciones de llamadas de variantes somáticas para los resultados negativos previstos

Tipo de variante	Ausencia de llamadas observada ¹	Llamadas totales	Porcentaje de ausencia de llamadas	Llamadas negativas observadas ²	Llamadas evaluables totales	PNC	LCL al 95 % ³	UCL al 95 %
Estado natural	0	194922	0	194919	194922	>99,99	>99,99	100

¹ Ausencia de llamadas se define como una posición cromosómica de interés en la que no puede determinarse una variante (debido a una baja profundidad de cobertura).

² Llamada negativa se define como posiciones cromosómicas de interés en las que no se detecta una variante.

³ Intervalos de confianza bilateral del 95 % calculados utilizando el método de puntuación de Wilson.

La contribución de cada parámetro (instrumento, lote de reactivo, día, duplicado de biblioteca) a la variabilidad global se determinó mediante el análisis de los componentes de varianza utilizando la frecuencia de variantes como la variable de respuesta. La media de la desviación estándar global fue de 0,0062. Los duplicados de la preparación de bibliotecas continuaron siendo la fuente más significativa de variabilidad, representando el 50,7 % del total. El día, el instrumento y el lote de consumibles contribuyeron todos con menos del 1 % de la variabilidad total [Precisión dentro de un mismo laboratorio de las estimaciones de los componentes de la varianza para las frecuencias de variantes de las muestras Somatic \(somática\) en la página 69](#) (SD = desviación estándar).

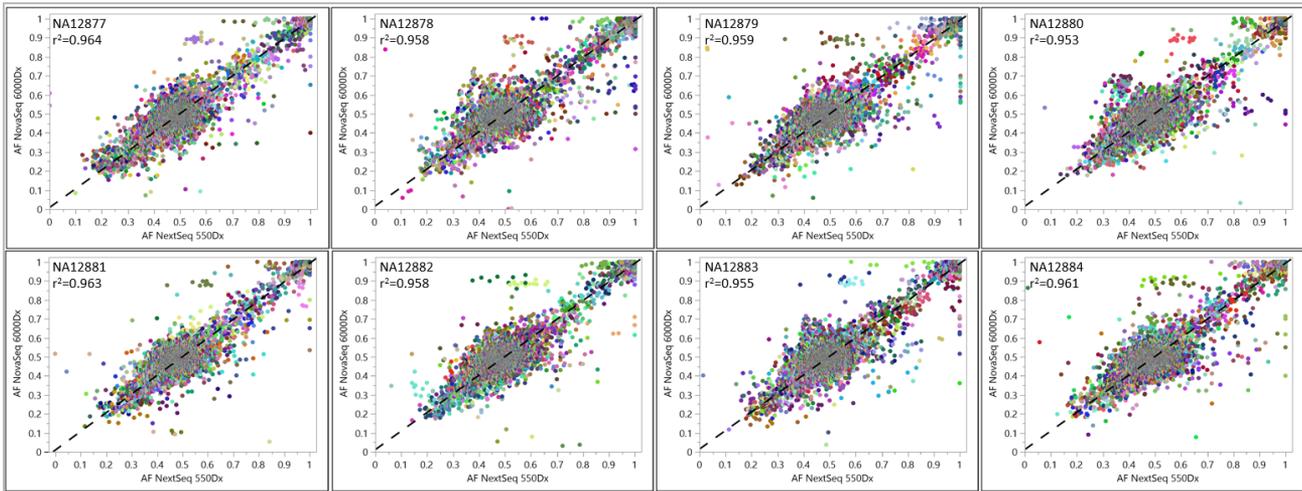
Tabla 30 Precisión dentro de un mismo laboratorio de las estimaciones de los componentes de la varianza para las frecuencias de variantes de las muestras Somatic (somática)

Componente	SD media	% medio de la SD total
Día	0,0002	0,41
Instrumento	0,0002	0,40
Lote de consumibles	0,0002	0,35
Duplicado de bibliotecas	0,0044	50,7
Total	0,0062	100

Comparación de métodos

Se realizó un estudio para comparar el rendimiento de los instrumentos NovaSeq 6000Dx y NextSeq 550Dx. Se evaluó la coincidencia de frecuencias de variantes en muestras de sangre utilizando un ensayo representativo diseñado para interrogar una serie de genes en 1 970 505 bases en los 23 cromosomas humanos. Se analizaron ocho muestras de ADN de Platinum Genomes, siete en duplicados de seis y una (NA12881) en duplicados de cinco. Las bibliotecas se secuenciaron en el Instrumento NovaSeq 6000Dx utilizando el flujo de trabajo de análisis de la generación de archivos FASTQ y VCF Germline de la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, y en el instrumento NextSeq 550Dx utilizando el módulo de Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx. [Gráficos de correlación de frecuencias de variantes \(Los puntos se colorean por variante única. Las variantes pueden colorearse de forma diferente en cada gráfico individual\).](#) en la página 70 representa la correlación de VAF entre los dos instrumentos para cada muestra. Debido a la fuerte correlación entre los instrumentos Instrumento NovaSeq 6000Dx y NextSeq 550Dx, se determina que las características de rendimiento relacionadas con los factores preanalíticos (por ejemplo, los métodos de extracción y las sustancias interferentes) se pueden aplicar a ambos instrumentos. Consulte las instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx para obtener más detalles.

Figura 15 Gráficos de correlación de frecuencias de variantes (Los puntos se colorean por variante única. Las variantes pueden colorearse de forma diferente en cada gráfico individual).



Reproducibilidad

La reproducibilidad del Instrumento NovaSeq 6000Dx se evaluó usando muestras de Platinum Genomes con un ensayo representativo diseñado para buscar una variedad de genes en 1 970 505 bases de 23 cromosomas diferentes utilizando 9232 oligonucleótidos de interés. Se evaluaron un total de 1723 variantes pequeñas de interés (SNV, inserciones y deleciones). Las pruebas de Germline (germinal) se componían de tres o cuatro duplicados de doce muestras únicas de Platinum Genomes. Las pruebas de Somatic (somática) se componían de cinco o seis duplicados de ocho muestras únicas tratadas con FFPE de Platinum Genomes a diferentes niveles de VAF. Las bibliotecas de muestras se prepararon utilizando reactivos del kit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

El análisis se realizó en tres centros externos utilizando un lote de Kit de reactivos S2 v1.5 para NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) y otro de Kit de reactivos S4 v1.5 para NovaSeq 6000Dx (300 ciclos). Se utilizó un solo Instrumento NovaSeq 6000Dx en cada centro. Dos operadores llevaron a cabo las pruebas en cada centro. Cada operador llevó a cabo las pruebas en tres días de inicio no consecutivos para cada tipo de muestra en un total de 36 celdas de flujo en cada uno de los tres centros. Para cada día de inicio, se secuenciaron bibliotecas de muestras Germline (germinal) en el lado A del instrumento utilizando reactivos S2 y el flujo de trabajo de análisis de la generación de archivos FASTQ y VCF Germline de la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, y se secuenciaron bibliotecas de muestras Somatic (somática) en el lado B del instrumento utilizando reactivos S4 y el flujo de trabajo de análisis de la generación de archivos FASTQ y VCF Somatic de la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. El resultado fueron 18 celdas de flujo para cada flujo de trabajo de Germline (germinal) y Somatic (somática).

Germline (Línea germinal)

En los experimentos Germline (germinal), las ubicaciones genómicas en las que se detecta una variante germinal de interés se notifican como positivas. Para las variantes germinales positivas previstas, se evaluaron los datos del índice de ausencia de llamada y del porcentaje de llamadas positivas (PPC) en cada tipo de variante (SNV, inserción y delección). [Observaciones de llamadas de variantes germinales para los resultados positivos previstos por tipo de variante en la página 71](#) resume los índices observados, junto con los niveles de confianza superior e inferior (LCL/UCL) al 95 % calculados con el método Wilson para cada tipo de variante.

Tabla 31 Observaciones de llamadas de variantes germinales para los resultados positivos previstos por tipo de variante

Tipo de variante	Ausencia de llamadas observada ¹	Llamadas totales	Porcentaje de ausencia de llamadas	Llamadas positivas observadas ²	Llamadas evaluables totales	PPC	LCL al 95 % ³	UCL al 95 %
SNV	0	991026	0	990276	991026	99,92	99,92	99,93
Inserción	0	38358	0	38358	38358	100	99,99	100
Delección	0	34758	0	32228	34758	92,72	92,44	92,99

¹ Ausencia de llamadas se define como una posición cromosómica de interés en la que no puede determinarse una variante (debido a una baja profundidad de cobertura).

² Llamada positiva se define como posiciones cromosómicas de interés en las que se detecta una variante.

³ Intervalos de confianza bilateral del 95 % calculados utilizando el método de puntuación de Wilson.

Las ubicaciones genómicas en las que no se detecta una variante de interés se notifican como negativas (en estado natural). Para las variantes negativas previstas, se evaluaron los datos del índice de ausencia de llamadas y del porcentaje de llamadas negativas (PNC). [Observaciones de llamadas de variantes germinales para los resultados negativos previstos en la página 71](#) resume los índices observados, junto con los niveles de confianza superior e inferior (LCL/UCL) al 95 % calculados con el método Wilson.

Tabla 32 Observaciones de llamadas de variantes germinales para los resultados negativos previstos

Tipo de variante	Ausencia de llamadas observada ¹	Llamadas totales	Porcentaje de ausencia de llamadas	Llamadas negativas observadas ²	Llamadas evaluables totales	PNC	LCL al 95 % ³	UCL al 95 %
Estado natural	0	393516	0	393516	393516	100	>99,99	100

¹ Ausencia de llamadas se define como una posición cromosómica de interés en la que no puede determinarse una variante (debido a una baja profundidad de cobertura).

² Llamada negativa se define como posiciones cromosómicas de interés en las que no se detecta una variante.

³ Intervalos de confianza bilateral del 95 % calculados utilizando el método de puntuación de Wilson.

Somático

En los experimentos Somatic (somática), las ubicaciones genómicas en las que se detecta una variante somática de interés se notifican como positivas (variante). Para las variantes somáticas con resultados positivos previstos con una frecuencia alélica de variantes (VAF) media mayor o igual al 14 % y menor o igual al 28 %, los datos se evaluaron para el índice de ausencia de llamadas y el porcentaje de llamadas positivas (PPC) en cada tipo de variante (SNV, inserción, delección). [Observaciones de Llamadas de Somatic \(somática\) para los resultados positivos previstos por tipo de variante \(VAF media \$\geq 14\$ % y \$\leq 28\$ %\) en la página 72](#) resume los índices observados, junto con los niveles de confianza superior e inferior (LCL/UCL) al 95 % calculados con el método Wilson para cada tipo de variante.

Tabla 33 Observaciones de llamadas de Somatic (somática) para los resultados positivos previstos por tipo de variante (VAF media ≥ 14 % y ≤ 28 %)

Tipo de variante	Ausencia de llamadas observada ¹	Llamadas totales	Porcentaje de ausencia de llamadas	Llamadas positivas observadas ²	Llamadas evaluables totales	PPC	LCL al 95 % ³	UCL al 95 %
SNV	0	71028	0	70314	71028	98,99	98,92	99,07
Inserción	0	1962	0	1962	1962	100	99,80	100
Delección	0	2142	0	2098	2142	97,95	97,25	98,47

¹ Ausencia de llamadas se define como una posición cromosómica de interés en la que no puede determinarse una variante (debido a una baja profundidad de cobertura).

² Llamada positiva se define como posiciones cromosómicas de interés en las que se detecta una variante.

³ Intervalos de confianza bilateral del 95 % calculados utilizando el método de puntuación de Wilson.

Las ubicaciones genómicas en las que no se detecta una variante somática de interés se notifican como negativas (en estado natural). Para las ubicaciones negativas previstas, se evaluaron los datos del índice de ausencia de llamadas y del porcentaje de llamadas negativas. [Observaciones de Llamadas de Somatic \(somática\) para los resultados negativos previstos en la página 72](#) resume los índices observados, junto con los niveles de confianza superior e inferior (LCL/UCL) al 95 % calculados con el método Wilson para cada tipo de variante.

Tabla 34 Observaciones de llamadas de Somatic (somática) para los resultados negativos previstos

Tipo de variante	Ausencia de llamadas observada ¹	Llamadas totales	Porcentaje de ausencia de llamadas	Llamadas negativas observadas ²	Llamadas evaluables totales	PNC	LCL al 95 % ³	UCL al 95 %
Estado natural	0	92718	0	92714	92718	>99,99	99,99	100

¹ Ausencia de llamadas se define como una posición cromosómica de interés en la que no puede determinarse una variante (debido a una baja profundidad de cobertura).

² Llamada negativa se define como posiciones cromosómicas de interés en las que no se detecta una variante.

³ Intervalos de confianza bilateral del 95 % calculados utilizando el método de puntuación de Wilson.

Historial de revisiones

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de documento 200025276 v01	Septiembre de 2022	Actualización de los datos de precisión para las observaciones de llamadas de variantes germinales.
N.º de documento 200025276 v00	Agosto de 2022	Publicación inicial.

Patentes y marcas comerciales

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

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

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

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

© 2022 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

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

Información de contacto



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



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Países Bajos

Patrocinador australiano

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

Etiquetado de productos

Para obtener una información detallada sobre los símbolos que aparecen en las etiquetas o en el embalaje del producto, consulte la leyenda que se ofrece en support.illumina.com en la ficha *Documentation* (Documentación) del kit.