

# Instrumento MiSeqDx<sup>®</sup>

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

N.º de catálogo DX-410-1001

## Uso previsto

El MiSeqDx de Illumina es un instrumento de secuenciación que mide las señales de fluorescencia de nucleótidos marcados mediante el uso de reactivos específicos para el instrumento y las celdas de flujo (kit MiSeqDx Universal 1.0), hardware de adquisición de imágenes y software de análisis de datos. La plataforma MiSeqDx está indicada para la secuenciación selectiva de ADN genómico humano de muestras de sangre periférica humana total. La plataforma MiSeqDx no está indicada para la secuenciación de genoma completo o de novo.

## Principios de procedimiento

El instrumento MiSeqDx de Illumina se ha diseñado para la resecuenciación selectiva de ADN genómico humano a partir de muestras de sangre total periférica con consumibles proporcionados por Illumina. El ADN genómico se procesa mediante el procedimiento de preparación de bibliotecas, que amplifica específicamente las regiones genómicas previstas de cada muestra con los oligonucleótidos personalizados diseñados por el usuario, a la vez que también se añaden las secuencias de captura de la celda de flujo y los índices a los productos amplificados. La preparación de bibliotecas consta de cuatro pasos clave: hibridación, extensión-ligadura, amplificación PCR y normalización de bibliotecas. Las bibliotecas de muestras normalizadas resultantes están listas para la secuenciación en el instrumento MiSeqDx de Illumina mediante el uso de la química de SBS (secuenciación por síntesis). La química de SBS utiliza un método basado en terminadores reversibles para detectar bases de nucleótidos únicos en la incorporación a las cadenas de ADN en crecimiento. El software de análisis en tiempo real (RTA) realiza análisis de imágenes y llamadas de bases. Asimismo, asigna una puntuación de calidad a cada base de cada ciclo de secuenciación. Cuando finaliza el análisis principal, el software MiSeq Reporter del instrumento MiSeqDx procesa las llamadas de bases mediante el análisis secundario, que incluye el demultiplexado, la generación de archivos FASTQ, la alineación, las llamadas de variantes y la generación de archivos VCF que contienen información sobre las variantes que se encuentran en posiciones específicas en un genoma de referencia.

## Limitaciones del procedimiento

- 1 Para uso diagnóstico *in vitro*.
- 2 Este producto ofrece lo siguiente:
  - Rendimiento de secuenciación: >1 Gb
  - Lecturas: >3 millones
  - Longitud de lectura (en experimento “paired-end”): 2 × 150 pb
  - Bases por encima de Q30: >75 % (más de un 75 % de las bases tiene una puntuación de calidad según la escala de Phred superior a 30, lo que implica una precisión de la llamada de bases superior al 99,9 %)
- 3 Las variantes en experimentos homopoliméricos de más de ocho bases se filtrarán en los archivos VCF (filtro R8).
- 4 Se ha validado el sistema para la detección de variantes de nucleótido único y deleciones de hasta tres bases. La evaluación de inserciones de una base se ha limitado a tres inserciones diferentes en tres cromosomas independientes.
- 5 El sistema presenta problemas a la hora de detectar deleciones o inserciones de una base en trectos homopoliméricos como, por ejemplo, poli-A.
- 6 El sistema MiSeqDx se ha diseñado para ofrecer resultados cualitativos (es decir, de genotipo).

- 7 Del mismo modo que con cualquier flujo de trabajo basado en hibridación, los polimorfismos, las mutaciones, las inserciones o las deleciones subyacentes en regiones de oligonucleótidos unidos pueden afectar a los alelos que se comprueban y, en consecuencia, a las llamadas realizadas.
- 8 La cobertura mínima recomendada por amplicón necesaria para la llamada de variantes precisa ( $Q(\max\_gt \mid \text{poly\_site}) \geq 100$ ) es de 75x.

## Componentes del producto

El instrumento MiSeqDx de Illumina consta de lo siguiente:

- Instrumento MiSeqDx (n.º de catálogo DX-410-1001)

Se requieren los siguientes componentes de software para el funcionamiento de MiSeqDx y el análisis de datos:

Aplicación de software	Función	Descripción
MOS: Sistema operativo de MiSeqDx	Controla el funcionamiento del instrumento.	La aplicación de software de MOS controla el funcionamiento del instrumento durante la secuenciación y genera imágenes para que las utilice el software de análisis en tiempo real (RTA).
RTA: Software de análisis en tiempo real	Realiza el análisis principal.	La aplicación de software de RTA convierte las imágenes que genera MOS de cada placa por ciclo de experimento de secuenciación en archivos de llamada de bases, que son entradas del software MiSeq Reporter. La aplicación del software de RTA no contiene interfaz de usuario.
MiSeq Reporter	Realiza el análisis secundario.	El software MiSeq Reporter procesa las llamadas de bases mediante el análisis secundario, que incluye el demultiplexado, la generación de archivos FASTQ, la alineación, las llamadas de variantes y la generación de archivos VCF que contienen información sobre las variantes que se encuentran en posiciones específicas en un genoma de referencia.

## Almacenamiento y manipulación

Elemento	Especificación
Temperatura	Transporte y almacenamiento: De -10 a 40 °C (de 14 a 104 °F) Condiciones de funcionamiento: De 19 °C a 25 °C (de 66 °F a 77 °F)
Humedad	Transporte y almacenamiento: Humedad sin condensación Condiciones de funcionamiento: Humedad relativa del 30 al 75 % (sin condensación)

## Materiales y equipo necesarios no suministrados

### Consumibles de secuenciación

Kit MiSeqDx Universal 1.0 (n.º de catálogo DX-103-1001)

### Consumibles proporcionados por el usuario

Antes de iniciar un experimento, asegúrese de que estén disponibles los siguientes consumibles proporcionados por el usuario.

Consumible	Finalidad
Paño humedecido en alcohol isopropílico al 70 % o en etanol al 70 %	Limpieza del soporte de la celda de flujo
Toallita de laboratorio sin pelusa	Limpieza de la platina de la celda de flujo
Papel para lentes (10 × 15 cm [4 × 6 in])	Limpieza de la celda de flujo

Consumible	Finalidad
Tween 20	Limpieza del instrumento
Pinzas de plástico de punta cuadrada (opcionales)	Extracción de la celda de flujo del contenedor de transporte de celdas de flujo
Agua de laboratorio	Limpieza del instrumento

### Directrices para el agua de laboratorio

Utilice siempre agua de laboratorio para los procedimientos del instrumento. No utilice nunca agua corriente. Cualquiera de los siguientes son ejemplos aceptables:

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

## 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.

- 1 **Algunos componentes de los reactivos proporcionados por Illumina para su utilización con el instrumento MiSeqDx 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 utilizado como residuos químicos y deséchelos de conformidad con las normativas y leyes regionales, nacionales y locales aplicables.** Para obtener información sobre seguridad, salud y medioambiente, consulte la hoja de datos de seguridad en [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html). Consulte los prospectos de los productos correspondientes para obtener más información.
- 2 Algunos componentes de los kits de reactivos proporcionados por Illumina contienen 2-mercaptoetanol, un agente reductor. Consulte los prospectos de los productos correspondientes para obtener más información. Evite su inhalación o ingestión, o el contacto con la piel o los ojos, pues podrían producirse lesiones. Utilice el kit en un área bien ventilada y deseche los contenedores y los contenidos no utilizados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona. Para obtener más información, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
- 3 Manipule todas las muestras como si fueran agentes potencialmente infecciosos.
- 4 El incumplimiento de los procedimientos descritos puede provocar resultados erróneos o una reducción considerable de la calidad de las muestras.
- 5 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.
- 6 Se precisan prácticas de laboratorio adecuadas y procedimientos óptimos en materia de higiene en laboratorios para proteger los productos de PCR frente a la contaminación de reactivos, instrumentos y muestras de ADN genómico. La contaminación mediante PCR puede conllevar resultados poco precisos y fiables.
- 7 Para evitar la contaminación, asegúrese de que las áreas de preamplificación y posamplificación dispongan de equipos específicos (tales como pipetas, puntas de pipeta, mezclador vorticial y centrifugadora).
- 8 El apareamiento de muestras de índice debe coincidir exactamente con la hoja de muestras. Las incoherencias entre la hoja de muestras y la disposición de placas provocará la pérdida de identificación de muestras positivas y la generación de informes con resultados incorrectos.

- 9 Durante el paso de normalización de bibliotecas del prospecto del reactivo correspondiente, es muy importante resuspender por completo el pellet de bolas de la biblioteca. Esto resulta fundamental para lograr una densidad de grupos homogénea en la celda de flujo de MiSeqDx.
- 10 Cumpla los tiempos de incubación especificados en los pasos de normalización de bibliotecas tal y como se describe en el prospecto del reactivo correspondiente. Una incubación inadecuada puede afectar a la representación de bibliotecas y la densidad de grupos.
- 11 Se recomienda encarecidamente instalar un software antivirus proporcionado por el usuario para proteger el ordenador frente a virus informáticos. Consulte el manual del usuario para obtener instrucciones acerca de la instalación.
- 12 No utilice el MiSeqDx si se ha retirado alguno de los paneles. La utilización del instrumento con alguno de estos paneles retirados constituye una posible exposición a la tensión de línea, así como a tensiones de CC.
- 13 No toque la platina de la celda de flujo del 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.
- 14 El instrumento pesa aproximadamente 57 kg (126 libras) y podría provocar lesiones graves si se cae o se maneja de forma indebida.

## Notas de procedimiento

El rendimiento por experimento de MiSeqDx puede oscilar entre 8 y 48 muestras. Los cebadores de índice utilizados durante la amplificación PCR se deben elegir en función del rendimiento final de muestras que se desee con el fin de garantizar la diversidad de la secuencia de índice.



### NOTA

Para obtener un rendimiento máximo, proceda con la preparación de bibliotecas de hasta 96 muestras y, a continuación, divida las muestras en dos experimentos de secuenciación con un máximo de 48 muestras cada uno.

El MiSeqDx utiliza un LED verde para secuenciar bases G/T y un LED rojo para secuenciar bases A/C. En cada ciclo, se debe leer, al menos, uno de los dos nucleótidos de cada canal de color para garantizar un registro adecuado. Resulta importante mantener el equilibrio de colores de cada base de la lectura de índice que es objeto de secuenciación, ya que, de lo contrario, se podría producir un error de registro durante la secuenciación de la lectura del índice.

Si la secuenciación es inferior a 48 muestras en un experimento de secuenciación, seleccione los índices apropiados de acuerdo con sus secuencias para mantener el equilibrio de color en los canales verde y rojo. Como mínimo, los experimentos con entre 8 y 48 muestras deben incluir las combinaciones de cebadores de índice que se muestran en el prospecto del kit MiSeqDx Universal 1.0.

Para procesar con precisión experimentos más pequeños, como mínimo se debe disponer de ocho muestras. Si no se dispone de seis muestras únicas (excluidos los controles positivos y negativos), se puede completar el experimento con duplicados de muestras o con cualquier muestra de ADN genómico humano. Consulte el prospecto del kit MiSeqDx Universal 1.0 para obtener información sobre el conjunto mínimo de índices con equilibrio de color que utilizar para los experimentos de secuenciación de ocho muestras.

## Instrucciones de uso

Las siguientes instrucciones de uso del instrumento MiSeqDx requieren reactivos que se suministran con el kit MiSeqDx Universal 1.0.

### Preparación de la hoja de muestras de MiSeqDx

- 1 En la pantalla de bienvenida de Illumina Worklist Manager, seleccione **Create Worklist** (Crear lista de trabajo).
- 2 En el campo Test Type (Tipo de prueba), seleccione **MiSeqDx Universal**.
- 3 En el campo Worklist Name (Nombre de la lista de trabajo), introduzca un nombre para la hoja de muestras.
  - Si se usa el ID alfanumérico del código de barras del cartucho de reactivo para el nombre de la hoja de muestras, MiSeq Operating Software (MOS) encontrará la hoja de muestras automáticamente.
  - Si se asigna otro nombre a la hoja de muestras, se puede usar el botón **Browse** (Examinar) del MiSeq Operating Software (MOS) para localizar la hoja de muestras correspondiente.

- 4 [Opcional] Escriba una descripción para identificar el experimento.
- 5 Asegúrese de que la fecha coincida con la fecha de inicio del experimento.
- 6 Seleccione **Next** (Siguiente).

#### Introducción de información de la muestra

- 1 En la ficha Table (Tabla) o la ficha Plate (Placa), introduzca la información siguiente para cada pocillo con muestra:
  - a **Sample ID** (ID de muestra): Introduzca un ID de muestra único.
  - b **Index 1** (Índice 1) e **Index 2** (Índice 2): Especifique el adaptador de índices que se utilizará para cada lectura del índice.
  - c **Manifest** (Manifiesto): Especifique el nombre del archivo de manifiesto que contiene información sobre las muestras del pocillo específico.
- 2 [Opcional] Para registrar información más detallada sobre las muestras, introduzca un nombre y una descripción de la muestra.
- 3 [Opcional] Para identificar controles en la placa, seleccione Negative (Negativo) o Positive (Positivo) en el menú desplegable **Control**.
- 4 Vaya a la ficha Plate Graphic (Gráfico de placa) y utilice la opción **Copy to Clipboard** (Copiar al portapapeles) o **Print** (Imprimir) para capturar una imagen de la placa de muestras.
- 5 Seleccione **Finish** (Finalizar).

#### Preparación de muestras

Se deben seguir los pasos descritos a continuación de acuerdo con las instrucciones de uso del prospecto del kit MiSeqDx Universal 1.0:

- Hibridación de grupo de oligonucleótidos
- Eliminación de oligonucleótidos sin ligar
- Extensión-ligadura de oligonucleótidos ligados
- Amplificación PCR
- Limpieza de PCR
- Normalización de bibliotecas
- Agrupación de bibliotecas

#### Preparación del cartucho de reactivo

- 1 Descongele el cartucho de reactivo de MiSeqDx en un baño de agua con suficiente agua desionizada a temperatura ambiente como para sumergir la base del cartucho reactivo hasta la línea de agua impresa en este. Tenga en cuenta que el agua no debe sobrepasar la línea de nivel máximo de agua.
- 2 Deje que el cartucho de reactivo se descongele en el baño de agua a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora o hasta que se haya descongelado por completo.
- 3 Saque el cartucho del baño de agua y dé unos suaves toques en la mesa para que el agua salga de la base del cartucho. Seque la base del cartucho. Asegúrese de que no haya salpicaduras de agua en la parte superior del cartucho de reactivo.

#### Inspección del cartucho de reactivo

- 1 Invierta el cartucho de reactivo diez veces para mezclar los reactivos descongelados y luego inspeccione que todas las posiciones estén descongeladas.



#### NOTA

Es esencial que los reactivos del cartucho estén completamente descongelados y mezclados para garantizar una correcta secuenciación.

- 2 Inspeccione los reactivos de las posiciones 1, 2 y 4 para asegurarse de que se hayan mezclado completamente y no presenten precipitados.

- 3 Golpee suavemente el cartucho en el banco para reducir las burbujas de aire en los reactivos.



## NOTA

Los tubos del dispensador del MiSeqDx acceden al fondo de cada depósito para aspirar los reactivos, de modo que es importante que estos no presenten burbujas de aire.

- 4 Coloque el cartucho de reactivo en hielo o almacénelo a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C (hasta seis horas) hasta que esté listo para configurar el experimento. Para obtener unos resultados óptimos, proceda directamente con la carga de la muestra y la configuración del experimento.

## Preparación de muestras para secuenciación

- 1 Continúe con un tubo **DAL** para la secuenciación.
- 2 Si el tubo **DAL** se almacenó congelado, descongélelo por completo y mézclelo pipeteando arriba y abajo.
- 3 Añada 6 µl de control interno PhiX de 20 pM al tubo **DAL**.
- 4 Pipetee arriba y abajo entre tres y cinco veces para enjuagar la punta y garantizar una transferencia completa.
- 5 Mezcle el tubo **DAL** agitándolo en un mezclador vorticial a velocidad máxima.
- 6 Centrifugue el tubo **DAL** a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- 7 Incube el tubo **DAL** en un termobloque a 96 °C durante dos minutos.
- 8 Tras la incubación, invierta el tubo **DAL** una o dos veces para mezclar y, a continuación, colóquelo inmediatamente en el baño de agua con hielo.
- 9 Mantenga el tubo **DAL** en el baño de agua con hielo durante cinco minutos.



## NOTA

Ejecute el paso de desnaturalización térmica inmediatamente antes de cargar el tubo **DAL** en el cartucho de reactivos de MiSeqDx con el fin de garantizar una carga de cadenas molde eficaz en la celda de flujo de MiSeqDx.

## Carga de bibliotecas de muestras en cartuchos

- 1 Utilice una punta de pipeta de 1 ml independiente, limpia y vacía para perforar el cierre metálico situado por encima del depósito del cartucho de reactivo etiquetado como **Load Samples** (Carga de muestras).
- 2 Pipetee 600 µl de las bibliotecas de muestras **DAL** en el depósito **Load Samples** (Carga de muestras). Evite tocar el sello metálico.
- 3 Compruebe la presencia de burbujas de aire en el depósito tras la carga de muestras. En caso de que haya burbujas de aire, golpee suavemente el cartucho sobre la mesa para eliminar las burbujas.
- 4 Continúe directamente con los pasos de configuración del experimento mediante la interfaz del MiSeq Operating Software (MOS).

## Configuración del experimento

- 1 Inicie sesión en el MiSeq Operating Software (MOS).
- 2 Seleccione **Sequence** (Secuenciar).  
Se abrirá un conjunto de pantallas de configuración del experimento en el siguiente orden: Select Run Type (Seleccionar tipo de experimento), Load Flow Cell (Cargar celda de flujo), Load Reagents (Cargar reactivos), Review (Revisar) y Pre-Run Check (Comprobación previa al experimento).
- 3 Seleccione **Diagnostic Run** (Experimento diagnóstico).
- 4 Cuando aparezca la pantalla Load Flow Cell (Cargar celda de flujo), limpie la celda de flujo y, después, cárguela.
- 5 Cierre la puerta del compartimento de la celda de flujo y el cierre de la celda de flujo.  
Tanto el cierre como la puerta del compartimento deben estar cerrados antes de iniciar el experimento. Cuando la celda de flujo está cargada, el software lee y registra la RFID. Aparecerá una confirmación de que la RFID se ha leído correctamente en la esquina inferior derecha de la pantalla.

- 6 Cuando aparezca la pantalla Load Reagents (Cargar reactivos), vacíe la botella de residuos, cargue la botella de solución SBS de MiSeqDx (PR2) y, a continuación, cargue el cartucho de reactivo.  
Cuando la botella de solución SBS de MiSeqDx (PR2) y el cartucho de reactivo están cargados, el software lee y registra la RFID. Aparecerá una confirmación de que la RFID se ha leído correctamente en la esquina inferior derecha de la pantalla.
- 7 Seleccione la hoja de muestras correspondiente.  
El software buscará de forma predeterminada un archivo de hoja de muestras cuyo nombre coincida con el número del código de barras del cartucho de reactivo cargado en el instrumento.
- 8 Confirme la configuración del experimento y los resultados de la comprobación previa al experimento.
- 9 Inicie el experimento.  
La pantalla Sequencing (Secuenciación) se abre cuando empieza el experimento. Esta pantalla proporciona una representación visual del experimento en curso, incluidas las intensidades y las puntuaciones de calidad (puntuaciones Q).

## Resultados

El software de análisis principal integrado (análisis en tiempo real [RTA]) realiza análisis de imágenes y llamadas de bases. Asimismo, asigna una puntuación de calidad a cada base de cada ciclo de secuenciación. Cuando finaliza el análisis principal, el software MiSeq Reporter del instrumento MiSeqDx inicia el análisis secundario, tal y como se describe a continuación.

### Demultiplexado

El demultiplexado es el primer paso en el análisis si la hoja de muestras contiene varias muestras y el experimento tiene lecturas de índice. El demultiplexado separa datos de las muestras agrupadas en función de las secuencias de índice cortas que marcan las muestras de diferentes bibliotecas. Cada secuencia de lectura del índice se compara con las secuencias de índice especificadas en la hoja de muestras. En este paso, no se considera ningún valor de calidad.

### Generación de archivos FASTQ

Tras el demultiplexado, MiSeq Reporter genera archivos intermedios en el formato FASTQ, que es un formato de texto empleado para representar secuencias. Los archivos FASTQ contienen las lecturas de cada muestra y las puntuaciones de calidad, excepto las lecturas de los grupos que no hayan superado el filtro. La puntuación de calidad Q se calcula del siguiente modo:  $-10 \log_{10} P$ , donde P es la probabilidad de que la llamada de bases sea incorrecta.

### Alineación

La alineación compara secuencias con la referencia para identificar una relación entre las secuencias y asigna una puntuación en función de las regiones de similitud. Las lecturas alineadas se escriben en archivos con formato BAM. En el caso del kit MiSeqDx Universal 1.0, el software MiSeq Reporter utiliza un algoritmo de Smith-Waterman de bandas que realiza las alineaciones de secuencias locales para determinar regiones similares entre dos secuencias.

### Llamadas de variantes

En el caso del kit MiSeqDx Universal 1.0, el software MiSeq Reporter utiliza el llamador de variantes Starling, que llama a las SNP y las pequeñas inserciones y deleciones. Asimismo, realiza el resumen de la profundidad y la probabilidad de cada posición en el genoma. Starling genera informes en formato HTML de SNP e inserciones y deleciones, así como archivos de texto delimitado por tabulaciones con variantes en formato VCF. Para obtener información sobre cómo calcular resultados de los archivos VCF, consulte la *Guía del usuario de MiSeq Reporter (n.º de documento 15039188)*.

### Precisión

Se llevaron a cabo tres estudios independientes para evaluar la precisión de la plataforma MiSeqDx.

## Estudio 1

En este estudio se ha empleado un ensayo típico diseñado para buscar una variedad de genes en 24 434 bases de 19 cromosomas diferentes con posibles exones clínicamente relevantes. Las 13 muestras únicas utilizadas en este estudio corresponden a dos padres y 11 niños que varios laboratorios habían secuenciado con frecuencia mediante diferentes metodologías de secuenciación. Seis muestras pertenecen a mujeres y siete muestras, a hombres. Se determinó la precisión de las variantes de nucleótido único (SNV) mediante la comparación de los datos del estudio con una base de datos de referencia bien definida. La secuencia de la base de datos de referencia se obtuvo a partir de la combinación de varias metodologías de secuenciación, datos públicos e información hereditaria. Se creó la siguiente tabla para evaluar la precisión del sistema en función de los datos del primer experimento del estudio. No se repitió ninguna prueba de este estudio.

Los resultados de este estudio se muestran a continuación.



Tabla 1 Datos de precisión en el nivel del amplicón del estudio 1 para la plataforma MiSeqDx

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas <sup>2</sup>	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar <sup>3</sup>	N.º de ausencia de llamadas <sup>4</sup>	N.º de llamadas correctas por muestra <sup>5</sup>	N.º de llamadas incorrectas <sup>6</sup>	% de llamadas correctas <sup>7</sup>
1	1	132	Poli-C (5), 63 % de GC	13	15	132	0	132	0	100
2	1	128	Poli-T (5)	13	15	128	0	128	0	100
3	2	133	-	13	15	133	0	133	0	100
4	2	119	-	13	15	119	0	119	0	100
5	2	127	Poli-T (5)	13	15	127	0	127	0	100
6	2	135	Poli-A (6)	13	15	135	0	135	0	100
7	2	122	Poli-T (5), Poli-C (5)	13	15	122	0	122	0	100
8	2	110	Poli-T (5)	13	15	110	0	110	0	100
9 <sup>8</sup>	2	131	Poli-A (14)	13	15	130-131	0	130-131	9	99,54
10	2	117	-	13	15	117	0	117	0	100
11	2	121	-	13	15	121	0	121	0	100
12	2	114	-	13	15	114	0	114	0	100
13	2	129	Poli-A (5)	13	15	129	0	129	0	100
14	3	131	Poli-A (5), Poli-T (5)	13	15	131	0	131	0	100
15	3	130	-	13	15	130	0	130	0	100
16	3	130	-	13	15	130	0	130	0	100
17	3	117	-	13	15	117	0	117	0	100
18	3	136	Poli-T (5)	13	15	136	0	136	0	100

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas <sup>2</sup>	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar <sup>3</sup>	N.º de ausencia de llamadas <sup>4</sup>	N.º de llamadas correctas por muestra <sup>5</sup>	N.º de llamadas incorrectas <sup>6</sup>	% de llamadas correctas <sup>7</sup>
19	3	131	Poli-T (5), SNV	13	15	131	0	131	0	100
20	3	123	Poli-A (5)	13	15	123	0	123	0	100
21	3	117	Poli-A (6), Poli-T (5), Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	117	0	117	0	100
22	3	119	Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	119	0	119	0	100
23	3	120	-	13	15	120	0	120	0	100
24	3	129	Poli-T (5)	13	15	129	0	129	0	100
25	4	133	Poli-C (7), 66 % de GC	13	15	133	0	133	0	100
26	4	135	Poli-C (5), 69 % de GC	13	15	135	0	135	0	100
27	4	123	SNV	13	15	123	0	123	0	100
28	4	134	-	13	15	134	0	134	0	100
29	4	132	-	13	15	132	0	132	0	100
30	4	121	Poli-A (5), SNV	13	15	121	0	121	0	100
31	4	125	-	13	15	125	0	125	0	100
32	4	134	Poli-T (5)	13	15	134	0	134	0	100
33	4	118	-	13	15	118	0	118	0	100
34	4	122	Poli-A (5)	13	15	122	0	122	0	100

Amplión	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplión	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas <sup>2</sup>	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar <sup>3</sup>	N.º de ausencia de llamadas <sup>4</sup>	N.º de llamadas correctas por muestra <sup>5</sup>	N.º de llamadas incorrectas <sup>6</sup>	% de llamadas correctas <sup>7</sup>
35	4	131	-	13	15	131	0	131	0	100
36	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
37	4	128	Poli-T (6)	13	15	128	0	128	0	100
38	4	131	-	13	15	131	0	131	0	100
39	4	129	Poli-A (5), Poli-T (5), SNV	13	15	129	0	129	0	100
40	4	133	Poli-T (5), SNV	13	15	133	0	133	0	100
41	4	112	SNV	13	15	112	0	112	0	100
42	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
43	4	135	-	13	15	135	0	135	0	100
44	4	122	-	13	15	122	0	122	0	100
45	4	117	-	13	15	117	0	117	0	100
46 <sup>9</sup>	4	124	-	13	15	125	0	125	0	100
47	4	117	Poli-T (5)	13	15	117	0	117	0	100
48	4	128	Poli-A (7)	13	15	128	0	128	0	100
49	4	123	Poli-A (6)	13	15	123	0	123	0	100
50	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
51	4	112	-	13	15	112	0	112	0	100
52	4	129	-	13	15	129	0	129	0	100
53	4	126	-	13	15	126	0	126	0	100

Amplión	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplión	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas <sup>2</sup>	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar <sup>3</sup>	N.º de ausencia de llamadas <sup>4</sup>	N.º de llamadas correctas por muestra <sup>5</sup>	N.º de llamadas incorrectas <sup>6</sup>	% de llamadas correctas <sup>7</sup>
54	4	132	-	13	15	132	0	132	0	100
55	5	131	-	13	15	131	0	131	0	100
56	5	119	-	13	15	119	0	119	0	100
57	5	120	Poli-A (5)	13	15	120	0	120	0	100
58	5	119	-	13	15	119	0	119	0	100
59	5	118	-	13	15	118	0	118	0	100
60	5	112	-	13	15	112	0	112	0	100
61	5	120	-	13	15	120	0	120	0	100
62	5	120	Poli-A (5)	13	15	120	0	120	0	100
63	5	115	CT(5)	13	15	115	0	115	0	100
64	5	112	SNV	13	15	112	0	112	0	100
65	5	135	Poli-T (6)	13	15	135	0	135	0	100
66	5	131	63 % de GC	13	15	131	0	131	0	100
67	5	121	-	13	15	121	0	121	0	100
68	5	132	Poli-A (6), Poli-T (8)	13	15	132	0	132	0	100
69	7	133	-	13	15	133	0	133	0	100
70	7	120	60 % de GC	13	15	120	0	120	0	100
71	7	135	-	13	15	135	0	135	0	100
72	7	126	Poli-A (5), 59 % de GC	13	15	126	0	126	0	100

Amplión	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplión	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas <sup>2</sup>	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar <sup>3</sup>	N.º de ausencia de llamadas <sup>4</sup>	N.º de llamadas correctas por muestra <sup>5</sup>	N.º de llamadas incorrectas <sup>6</sup>	% de llamadas correctas <sup>7</sup>
73	7	134	-	13	15	134	0	134	0	100
74	7	122	Poli-C (5), 63 % de GC	13	15	122	0	122	0	100
75	7	127	59 % de GC; SNV	13	15	127	0	127	0	100
76	7	123	-	13	15	123	0	123	0	100
77	7	125	-	13	15	125	0	125	0	100
78	7	133	Poli-A (5), Poli-T (5)	13	15	133	0	133	0	100
79	7	116	-	13	15	116	0	116	0	100
80	7	135	-	13	15	135	0	135	0	100
81	7	118	-	13	15	118	0	118	0	100
82	7	136	67 % de GC	13	15	136	0	136	0	100
83	7	131	58 % de GC	13	15	131	0	131	0	100
84	7	119	Poli-G (6), 61 % de GC	13	15	119	0	119	0	100
85	7	122	Poli-T (5)	13	15	122	0	122	0	100
86	7	123	Poli-A (6)	13	15	123	0	123	0	100
87	8	127	60 % de GC	13	15	127	0	127	0	100
88	8	129	57 % de GC	13	15	129	0	129	0	100
89	9	130	Poli-T (5)	13	15	130	0	130	0	100
90	9	116	-	13	15	116	0	116	0	100

Amplión	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplión	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas <sup>2</sup>	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar <sup>3</sup>	N.º de ausencia de llamadas <sup>4</sup>	N.º de llamadas correctas por muestra <sup>5</sup>	N.º de llamadas incorrectas <sup>6</sup>	% de llamadas correctas <sup>7</sup>
91	9	119	Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	119	0	119	0	100
92	9	121	-	13	15	121	0	121	0	100
93	9	117	Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	117	0	117	0	100
94	9	114	-	13	15	114	0	114	0	100
95 <sup>10</sup>	9	129	Poli-A (14)	13	15	130	0	129 (de 130)	15	99,23
96	9	114	Región homóloga en un cromosoma diferente; SNV	13	15	114	0	114	0	100
97	9	122	-	13	15	122	0	122	0	100
98	9	127	Poli-A (5), Poli-C (5)	13	15	127	0	127	0	100
99	9	133	-	13	15	133	0	133	0	100
100	9	138	64 % de GC	13	15	138	0	138	0	100
101	9	139	-	13	15	139	0	139	0	100
102	9	116	-	13	15	116	0	116	0	100
103	9	133	Poli-A (5), 57 % de GC	13	15	133	0	133	0	100
104	9	138	57 % de GC	13	15	138	0	138	0	100
105	9	136	Poli-C (5), 67 % de GC	13	15	136	0	136	0	100
106	9	118	70 % de GC	13	15	118	0	118	0	100
107	10	128	62 % de GC	13	15	128	0	128	0	100

Amplión	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplión	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas <sup>2</sup>	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar <sup>3</sup>	N.º de ausencia de llamadas <sup>4</sup>	N.º de llamadas correctas por muestra <sup>5</sup>	N.º de llamadas incorrectas <sup>6</sup>	% de llamadas correctas <sup>7</sup>
108	10	120	60 % de GC	13	15	120	0	120	0	100
109	10	139	58 % de GC; SNV	13	15	139	0	139	0	100
110	10	118	57 % de GC	13	15	118	0	118	0	100
111	10	123	Poli-T (5)	13	15	123	0	123	0	100
112	10	121	-	13	15	121	0	121	0	100
113	10	129	26 % de GC	13	15	129	0	129	0	100
114	10	122	-	13	15	122	0	122	0	100
115	10	124	Poli-T (5); Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	124	0	124	0	100
116	10	135	CA(4)	13	15	135	0	135	0	100
117	10	135	Poli-A (6); Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	135	0	135	0	100
118	10	119	Poli-C (5); SNV	13	15	119	0	119	0	100
119	10	125	-	13	15	125	0	125	0	100
120	10	131	-	13	15	131	0	131	0	100
121	10	117	-	13	15	117	0	117	0	100
122	10	116	-	13	15	116	0	116	0	100
123	10	129	58 % de GC	13	15	129	0	129	0	100
124	11	117	Poli-T (10)	13	15	117	0	117	0	100

Amplión	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplión	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas <sup>2</sup>	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar <sup>3</sup>	N.º de ausencia de llamadas <sup>4</sup>	N.º de llamadas correctas por muestra <sup>5</sup>	N.º de llamadas incorrectas <sup>6</sup>	% de llamadas correctas <sup>7</sup>
125	11	117	Poli-T (5)	13	15	117	0	117	0	100
126	11	113	Poli-A (5)	13	15	113	0	113	0	100
127	11	129	-	13	15	129	0	129	0	100
128	11	121	Poli-T (5)	13	15	121	0	121	0	100
129	11	123	-	13	15	123	0	123	0	100
130	11	127	Poli-A (6)	13	15	127	0	127	0	100
131	11	136	Poli-T (6)	13	15	136	0	136	0	100
132	11	132	Poli-T (5)	13	15	132	0	132	0	100
133	11	115	-	13	15	115	0	115	0	100
134	11	117	Poli-T (8); 19 % de GC	13	15	117	0	117	0	100
135	11	134	Poli-A (5); Poli-T (5)	13	15	134	0	134	0	100
136	11	131	Poli-A (5)	13	15	131	0	131	0	100
137	11	133	26 % de GC; SNV	13	15	133	0	133	0	100
138	11	137	Poli-T (8); SNV	13	15	137	0	137	0	100
139	11	131	Poli-A (5)	13	15	131	0	131	0	100
140	12	131	-	13	15	131	0	131	0	100
141	12	128	-	13	15	128	0	128	0	100
142	12	133	Poli-A (5)	13	15	133	0	133	0	100



Amplión	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplión	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas <sup>2</sup>	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar <sup>3</sup>	N.º de ausencia de llamadas <sup>4</sup>	N.º de llamadas correctas por muestra <sup>5</sup>	N.º de llamadas incorrectas <sup>6</sup>	% de llamadas correctas <sup>7</sup>
143	12	136	-	13	15	136	0	136	0	100
144	12	124	-	13	15	124	0	124	0	100
145	12	122	59 % de GC	13	15	122	0	122	0	100
146	13	122	-	13	15	122	0	122	0	100
147	13	116	Poli-C (5)	13	15	116	0	116	0	100
148	13	133	-	13	15	133	0	133	0	100
149	13	117	SNV	13	15	117	0	117	0	100
150	13	124	Poli-T (6)	13	15	124	0	124	0	100
151	13	123	Poli-T (5); 26 % de GC	13	15	123	0	123	0	100
152	13	115	Poli-A (5)	13	15	115	0	115	0	100
153	13	125	-	13	15	125	0	125	0	100
154	13	121	-	13	15	121	0	121	0	100
155	13	123	-	13	15	123	0	123	0	100
156	13	114	-	13	15	114	0	114	0	100
157	13	119	-	13	15	119	0	119	0	100
158	14	122	58 % de GC	13	15	122	0	122	0	100
159	16	122	-	13	15	122	0	122	0	100
160	16	121	-	13	15	121	0	121	0	100
161	16	123	Poli-C (5)	13	15	123	0	123	0	100
162	17	119	-	13	15	119	0	119	0	100

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas <sup>2</sup>	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar <sup>3</sup>	N.º de ausencia de llamadas <sup>4</sup>	N.º de llamadas correctas por muestra <sup>5</sup>	N.º de llamadas incorrectas <sup>6</sup>	% de llamadas correctas <sup>7</sup>
163	17	119	61 % de GC	13	15	119	0	119	0	100
164	17	135	-	13	15	135	0	135	0	100
165	17	116	Poli-C (6); 60 % de GC; SNV	13	15	116	0	116	0	100
166	17	123	-	13	15	123	0	123	0	100
167	17	116	62 % de GC	13	15	116	0	116	0	100
168	17	118	Poli-C (5); 65 % de GC	13	15	118	0	118	0	100
169	17	129	-	13	15	129	0	129	0	100
170	17	131	Poli-G (6); 67 % de GC; SNV	13	15	131	0	131	0	100
171	17	127	61 % de GC	13	15	127	0	127	0	100
172	17	118	Poli-C (5)	13	15	118	0	118	0	100
173	17	138	61 % de GC	13	15	138	0	138	0	100
174	17	131	58 % de GC	13	15	131	0	131	0	100
175	18	112	-	13	15	112	0	112	0	100
176	18	124	-	13	15	124	0	124	0	100
177	18	134	Poli-A (6)	13	15	134	0	134	0	100
178	18	129	-	13	15	129	0	129	0	100
179	18	133	-	13	15	133	0	133	0	100

Amplión	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplión	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas <sup>2</sup>	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar <sup>3</sup>	N.º de ausencia de llamadas <sup>4</sup>	N.º de llamadas correctas por muestra <sup>5</sup>	N.º de llamadas incorrectas <sup>6</sup>	% de llamadas correctas <sup>7</sup>
180	18	118	-	13	15	118	0	118	0	100
181	18	114	60 % de GC	13	15	114	0	114	0	100
182	18	118	-	13	15	118	0	118	0	100
183	19	122	Poli-G (6); 66 % de GC	13	15	122	0	122	0	100
184	19	139	64 % de GC	13	15	139	0	139	0	100
185	19	131	67 % de GC	13	15	131	0	131	0	100
186	19	141	59 % de GC; Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	141	0	141	0	100
187	19	121	Poli-C (5); 72 % de GC; Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	121	0	121	0	100
188	19	138	58 % de GC	13	15	138	0	138	0	100
189	19	123	64 % de GC	13	15	123	0	123	0	100
190	19	138	-	13	15	138	0	138	0	100
191	20	117	Poli-T (5)	13	15	117	0	117	0	100
192	22	136	Poli-A (7)	13	15	136	0	136	0	100
193	22	122	Poli-A (5); Poli-C (5)	13	15	122	0	122	0	100
194	22	122	62 % GC; SNV	13	15	122	0	122	0	100
195	22	119	66 % de GC	13	15	119	0	119	0	100

<sup>1</sup> "Fragmento analizado" hace referencia al tamaño de la región genómica secuenciada en bases, sin incluir cebadores específicos según el objetivo.

- <sup>2</sup> El número total de muestras enumeradas es 15 porque dos de las 13 muestras únicas analizadas se procesaron en dos experimentos independientes.
- <sup>3</sup> El número de muestras o llamadas que se pudo realizar es el número de bases que presentaban una calidad adecuada para que el sistema las llamara.
- <sup>4</sup> El número de ausencia de llamadas es el número de bases de un amplicón que genera una ausencia de llamada en el experimento.
- <sup>5</sup> El número de llamadas correctas por muestra es el número de bases del amplicón llamadas que arrojaron resultados que coincidían con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano y la referencia compuesta bien definida.
- <sup>6</sup> El número de llamadas incorrectas fue el número total de llamadas incorrectas de SNV (variantes de nucleótido único) o inserciones y deleciones en el amplicón. Se incluyen más detalles sobre las llamadas incorrectas en las siguientes notas al pie.
- <sup>7</sup> El porcentaje de llamadas correctas es igual al índice de llamadas correctas de todas las bases del amplicón, donde la llamada correcta de las SNV (variantes de nucleótido único) o inserciones y deleciones se basa en la información de referencia compuesta bien definida, y la llamada correcta de las bases en el resto de la secuenciación del amplicón se basa en la comparación con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano. Esta columna puede tener más de un resultado esperado para un amplicón dado si algunas de las muestras contienen una inserción o deleción y otras no, por ejemplo, el amplicón 9. El porcentaje de llamadas correctas de muestras con resultado incorrecto se muestra en la tabla.
- <sup>8</sup> El amplicón 9 incluye un experimento homopolimérico de 14 bases A de acuerdo con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano. Sin embargo, la información de referencia compuesta bien definida para 7 de 13 muestras tiene 13 bases A en este experimento homopolimérico. En estas siete muestras, esta deleción de un par de bases representa un falso negativo en el estudio de precisión de la secuenciación de MiSeqDx.
- <sup>9</sup> El amplicón 46 incluye una inserción de una base que se muestra en 9 muestras en la base de datos de referencia bien definida y se detecta correctamente en todas las muestras analizadas.
- <sup>10</sup> El amplicón 95 incluye un experimento homopolimérico de 14 bases A de acuerdo con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano. Sin embargo, las secuencias de referencia compuesta bien definida para 13 de 13 muestras tiene 15 bases A en este experimento homopolimérico. En estas 13 muestras, esta inserción de un par de bases representa un falso negativo en el estudio de precisión de la secuenciación de MiSeqDx.

La siguiente tabla contiene datos del estudio 1 presentados con la coincidencia de porcentaje negativo y positivo, donde los resultados de las variantes se comparan con la información de referencia compuesta bien definida para los cálculos de la coincidencia de porcentaje positivo. Dado que la información de referencia compuesta solo proporciona resultados de las variantes de nucleótido único y de las inserciones/deleciones, los resultados de la base no variante se comparan con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano para los cálculos de la coincidencia de porcentaje negativo. Todas las bases no variantes arrojaron una coincidencia del 100 % con la secuencia de referencia. Todas las variantes de nucleótido único arrojaron una coincidencia del 100 % con la secuencia de referencia. Las variantes perdidas eran inserciones de una base o deleciones de una base en regiones homopoliméricas.

**Tabla 2** Coincidencia de los resultados de la llamada de bases de la plataforma MiSeqDx con los datos de referencia de 13 muestras bien definidas

Muestra	N.º de amplicones	% de cobertura de amplicones <sup>1</sup>	Variantes esperadas por muestra <sup>2</sup>	Variantes llamadas correctamente	Variantes perdidas <sup>3</sup>	Bases no variantes llamadas correctamente	Coincidencia de porcentaje positivo <sup>4</sup> (%)	Coincidencia de porcentaje negativo <sup>5</sup> (%)
NA12877	195	100	19	17	2	24418	89,47	100
NA12878	195	100	19	17	2	24417	89,47	100
NA12879	195	100	20	19	1	24416	95,00	100
NA12880	195	100	20	18	2	24417	90,00	100
NA12881	195	100	22	20	2	24415	90,91	100
NA12882	195	100	16	15	1	24419	93,75	100
NA12883	195	100	24	23	1	24412	95,83	100
NA12884	195	100	21	20	1	24415	95,24	100
NA12885	195	100	19	17	2	24417	89,47	100
NA12886	195	100	22	20	2	24415	90,91	100
NA12887	195	100	19	18	1	24416	94,74	100
NA12888	195	100	24	23	1	24412	95,83	100
NA12893	195	100	20	18	2	24417	90,00	100

<sup>1</sup> El porcentaje de cobertura de amplicones es el número de bases de los amplicones secuenciados con confianza.

<sup>2</sup> Entre las variantes esperadas por muestra se incluyen tanto las variantes de nucleótido único como las inserciones y deleciones.

<sup>3</sup> Para las variantes perdidas, consulte la primera tabla del estudio 1 y las notas al pie de la 8 a la 10.

<sup>4</sup> Coincidencia de porcentaje positivo (PPA) =  $100 \times TP / (TP + FN)$ , donde los positivos verdaderos (TP) son el número de llamadas de variantes positivas en coordenadas genómicas donde las variantes se presentan de acuerdo con la secuencia de referencia y el alelo mutante llamado concuerda con la secuencia de referencia (columna llamada "Variantes llamadas correctamente"), y los falsos negativos (FN) es el número de llamadas de variantes negativas en coordenadas genómicas donde las variantes se presentan de acuerdo con la secuencia de referencia (columna llamada "Variantes perdidas").

<sup>5</sup> Coincidencia de porcentaje negativo (NPA) =  $100 \times TN / (FP + TN)$ , donde los falsos positivos (FP) son el número de llamadas de variantes positivas en coordenadas genómicas donde las variantes están ausentes de acuerdo con la secuencia de referencia, o si el alelo mutante llamado no concuerda con la secuencia de referencia (no se encuentra en la tabla, ya que no se realizaron llamadas de variantes de falsos positivos en este estudio) y los negativos verdaderos (TN) es el número de llamadas de variantes negativas en coordenadas genómicas donde las variantes están ausentes de acuerdo con el estándar de referencia (columna llamada "Bases no variantes llamadas correctamente").

## Estudio 2

Los resultados de la secuenciación del panel del amplicón anterior se compararon con un genotipo muy seguro definido para la NA12878 por el instituto de estándares y tecnología de EE. UU., National Institute of Standards and Technology (NIST) (v.2.15<sup>1</sup>). De los 195 amplicones, 184 se encontraban dentro de llamadas de referencia muy seguras de la secuencia del NIST y se compararon. Las llamadas de bases no variantes se compararon con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano.

**Tabla 3** Comparación de los resultados de secuenciación de la plataforma MiSeqDx para la muestra NA12878 con la base de datos del NIST

Muestra	N.º de amplicones	% de cobertura de amplicones <sup>2</sup>	Variantes esperadas	Variantes llamadas correctamente	Variantes perdidas	Bases no variantes llamadas correctamente	Coincidencia de porcentaje positivo <sup>3</sup> (%)	Coincidencia de porcentaje negativo <sup>4</sup> (%)
NA12878	184	100	17	16	1 <sup>5</sup>	23066	94,12	100

<sup>1</sup> Zook, JM et al. Integrating sequencing datasets to form highly confident SNP and indel genotype calls for a whole human genome. arXiv:1307.4661 [q-bio.GN].

<sup>2</sup> El porcentaje de cobertura de amplicones es el número de bases de los amplicones secuenciados con confianza.

<sup>3</sup> Coincidencia de porcentaje positivo (PPA) =  $100 \times TP / (TP + FN)$ .

<sup>4</sup> Coincidencia de porcentaje negativo (NPA) =  $100 \times TN / (FP + TN)$ .

<sup>5</sup> La variante perdida es la delección de un par de bases en el amplicón 9 durante el experimento homopolimérico de 14 bases A no llamadas por el instrumento MiSeqDx que está presente en la secuencia del NIST. Tenga en cuenta que la secuencia del NIST no incluye la inserción de un par de bases en el otro homopolímero de bases A que estaba presente en la otra base de datos de referencia utilizada anteriormente en el estudio 1.

## Estudio 3

Se llevó a cabo un estudio de precisión adicional para evaluar el rendimiento de pequeñas inserciones y delecciones en un ensayo típico, el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina, que incluía un subconjunto de variaciones genéticas de *CFTR* de interés clínico analizado con el software MiSeq Reporter mediante el flujo de trabajo de secuenciación selectiva de ADN de la plataforma MiSeqDx. Las inserciones y delecciones buscadas se detectaron donde se esperaba con gran certeza. Estas muestras se definieron mediante secuenciación bidireccional de Sanger como método de referencia para establecer la secuencia prevista.

**Tabla 4** Resumen de la detección de inserciones y delecciones con la plataforma MiSeqDx

Amplicón	Tamaño de fragmento	Contenido genómico del amplicón	N.º de llamadas/muestra que se pudo realizar	N.º de bases llamadas/muestra	N.º de ausencia de llamadas	N.º de llamadas correctas/muestra	N.º de llamadas incorrectas	% de llamadas correctas
1	129	Inserción de una base	130	130	0	130	0	100
2	154	Delección de tres bases	151	151	0	151	0	100
3	167	Delección de dos bases	165	165	0	165	0	100
4	134	Delección de una base	133	133	0	133	0	100
5	132	Delección de una base	131	131	0	131	0	100
6	129	Delección de una base	128	128	0	128	0	100

Los datos que arrojaron estos estudios de precisión corroboran la afirmación de que la plataforma MiSeqDx puede secuenciar con precisión lo siguiente:

- Contenido de GC  $\geq 19$  % (todas las bases de 135 de 135 amplicones secuenciados con un 19 % de contenido de GC se llamaron correctamente).
- Contenido de GC  $\leq 72$  % (todas las bases de 135 de 135 amplicones secuenciados con un 72 % de contenido de GC se llamaron correctamente).
- Longitudes de poli-A  $\leq 7$  (se llamó correctamente la repetición de poli-A de siete nucleótidos en 270 de 270 amplicones secuenciados con poli-A =7).
- Longitudes de poli-T  $\leq 8$  (se llamó correctamente la repetición de poli-T de ocho nucleótidos en 270 de 270 amplicones secuenciados con poli-T =8).
- Longitudes de poli-G  $\leq 6$  (se llamó correctamente la repetición de poli-G de seis nucleótidos en 405 de 405 amplicones secuenciados con poli-G =6).
- Longitudes de poli-C  $\leq 7$  (se llamó correctamente la repetición de poli-C de siete nucleótidos en 135 de 135 amplicones secuenciados con poli-C =7).
- Longitudes de repetición dinucleótida  $\leq 5\times$  (todas las bases de 135 de 135 amplicones secuenciados con repetición dinucleótida de  $5\times$  se llamaron correctamente).
- Longitudes de repetición trinucleótida  $\leq 4\times$  (todas las bases de 810 de 810 amplicones secuenciados con repeticiones trinucleótidas de  $4\times$  se llamaron correctamente).
- Inserciones de una base y deleciones de tres o menos bases
  - Dos de tres inserciones de una base comprobadas se llamaron correctamente. Se realizaron llamadas correctas para dos inserciones de una base en regiones no homopoliméricas en 82 amplicones. No se llamó una inserción de una base en un experimento homopolimérico de 14 bases A en el cromosoma 2 en 135 amplicones.
  - Tres de cuatro deleciones de una base se llamaron correctamente. Todas las llamadas correctas se realizaron en regiones no homopoliméricas en cuatro amplicones. No se llamó una deleción de una base en un experimento homopolimérico de 14 bases A en el cromosoma 9 en 63 amplicones.
  - Se llamaron correctamente deleciones de dos bases en una muestra.
  - Se llamaron correctamente deleciones de tres bases en 21 muestras.

## Reproducibilidad

La reproducibilidad de la plataforma MiSeqDx se determinó con dos ensayos típicos.

### Estudio 1

Se ha diseñado un ensayo típico para buscar una variedad de genes en 24 434 bases de 19 cromosomas diferentes con posibles exones clínicamente relevantes. En el estudio se analizaron 13 muestras en nueve experimentos con tres instrumentos MiSeqDx diferentes y tres operadores diferentes (Tabla 5). Se utilizaron dos lotes de consumibles de secuenciación y un único lote de reactivos de preparación de bibliotecas. Las 13 muestras corresponden a dos padres y 11 niños que varios laboratorios habían secuenciado con frecuencia mediante diferentes metodologías de secuenciación. Se analizaron dos muestras por duplicado, por lo que cada experimento arrojó resultados para 15 muestras.

Para la evaluación de la reproducibilidad lote a lote, se analizaron 94 muestras y dos controles sin cadena molde de los tres lotes. Cada lote se dividió para realizar dos experimentos de 48 muestras con el fin de analizar todos los reactivos y combinaciones de cebadores de índice posibles. Un único operador completó todos los experimentos de secuenciación con un único instrumento MiSeqDx con el fin de eliminar cualquier posible variación provocada por el operador o el instrumento (Tabla 6).

Se determinaron las llamadas correctas de las variantes de nucleótido único comparando los datos del estudio con información de referencia bien definida. No se obtuvieron experimentos erróneos ni se realizaron nuevos experimentos para el estudio de reproducibilidad. Las siguientes tablas muestran los resultados de los estudios para la evaluación de la reproducibilidad del sistema.

Tabla 5 Resultados de reproducibilidad entre instrumentos del estudio 1 de la plataforma MiSeqDx (nivel del amplicón)

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras procesadas <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>
1	1	132	Poli-C (5); 63 % de GC	135	0	0	100	23 <sup>6</sup>	0	99,61 <sup>7</sup>	39 <sup>6</sup>	0	99,34 <sup>7</sup>
2	1	128	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	2	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	2	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
5	2	127	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
6	2	135	Poli-A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
7	2	122	Poli-T (5); Poli-C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
8	2	110	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
9	2	131	Poli-A (14)	135	0	27 <sup>6</sup>	99,54	0	27 <sup>6</sup>	99,54	0	27 <sup>6</sup>	99,54
10	2	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
11	2	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
12	2	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
13	2	129	Poli-A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
14	3	131	Poli-A (5); Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
15	3	130	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
16	3	130	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
17	3	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100



Amplión	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplión	N.º de muestras procesadas <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>
18	3	136	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
19	3	131	Poli-T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
20	3	123	Poli-A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
21	3	117	Poli-A (6); Poli-T (5); Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
22	3	119	Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
23	3	120	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
24	3	129	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
25	4	133	Poli-C (7); 66 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
26	4	135	Poli-C (5); 69 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
27	4	123	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
28	4	134	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
29	4	132	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
30	4	121	Poli-A (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
31	4	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras procesadas <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>
32	4	134	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
33	4	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
34	4	122	Poli-A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
35	4	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
36	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
37	4	128	Poli-T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
38	4	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
39	4	129	Poli-A (5); Poli-T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
40	4	133	Poli-T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
41	4	112	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
42	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
43	4	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
44	4	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
45	4	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
46	4	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
47	4	117	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
48	4	128	Poli-A (7)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
49	4	123	Poli-A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras procesadas <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>
50	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
51	4	112	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
52	4	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
53	4	126	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
54	4	132	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
55	5	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
56	5	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
57	5	120	Poli-A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
58	5	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
59	5	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
60	5	112	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
61	5	120	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
62	5	120	Poli-A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
63	5	115	CT(5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
64	5	112	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
65	5	135	Poli-T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
66	5	131	63 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
67	5	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
68	5	132	Poli-A (6); Poli-T (8)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplión	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplión	N.º de muestras procesadas <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausencias de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencias de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencias de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>
69	7	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
70	7	120	60 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
71	7	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
72	7	126	Poli-A (5); 59 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
73	7	134	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
74	7	122	Poli-C (5); 63 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
75	7	127	59 % de GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
76	7	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
77	7	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
78	7	133	Poli-A (5); Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
79	7	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
80	7	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
81	7	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
82	7	136	67 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
83	7	131	58 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
84	7	119	Poli-G (6); 61 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplión	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplión	N.º de muestras procesadas <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausencias de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencias de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencias de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>
85	7	122	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
86	7	123	Poli-A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
87	8	127	60 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
88	8	129	57 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
89	9	130	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
90	9	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
91	9	119	Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
92	9	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
93	9	117	Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
94	9	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
95	9	129	Poli-A (14)	135	0	45 <sup>9</sup>	99,22	0	45 <sup>9</sup>	99,22	0	45 <sup>9</sup>	99,22
96	9	114	Región homóloga en un cromosoma diferente; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
97	9	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
98	9	127	Poli-A (5); Poli-C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras procesadas <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>
99	9	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
100	9	138	64 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
101	9	139	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
102	9	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
103	9	133	Poli-A (5); 57 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
104	9	138	57 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
105	9	136	Poli-C (5); 67 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
106	9	118	70 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
107	10	128	62 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
108	10	120	60 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
109	10	139	58 % de GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
110	10	118	57 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
111	10	123	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
112	10	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
113	10	129	26 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
114	10	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplión	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplión	N.º de muestras procesadas <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>
115	10	124	Poli-T (5); Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
116	10	135	CA(4)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
117	10	135	Poli-A (6); Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
118	10	119	Poli-C (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
119	10	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
120	10	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
121	10	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
122	10	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
123	10	129	58 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
124	11	117	Poli-T (10)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
125	11	117	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
126	11	113	Poli-A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
127	11	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
128	11	121	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
129	11	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplión	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplión	N.º de muestras procesadas <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>
130	11	127	Poli-A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
131	11	136	Poli-T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
132	11	132	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
133	11	115	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
134	11	117	Poli-T (8); 19 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
135	11	134	Poli-A (5); Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
136	11	131	Poli-A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
137	11	133	SNV; 26 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
138	11	137	Poli-T (8); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
139	11	131	Poli-A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
140	12	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
141	12	128	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
142	12	133	Poli-A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
143	12	136	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
144	12	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
145	12	122	59 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
146	13	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100



Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras procesadas <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausencias de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencias de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencias de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>
147	13	116	Poli-C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
148	13	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
149	13	117	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
150	13	124	Poli-T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
151	13	123	Poli-T (5); 26 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
152	13	115	Poli-A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
153	13	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
154	13	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
155	13	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
156	13	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
157	13	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
158	14	122	58 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
159	16	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
160	16	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
161	16	123	Poli-C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
162	17	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
163	17	119	61 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
164	17	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplión	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplión	N.º de muestras procesadas <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausencias de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencias de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencias de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>
165	17	116	Poli-C (6); 60 % de GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
166	17	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
167	17	116	62 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
168	17	118	Poli-C (5); 65 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
169	17	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
170	17	131	Poli-G (6); 67 % de GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
171	17	127	61 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
172	17	118	Poli-C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
173	17	138	61 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
174	17	131	58 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
175	18	112	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
176	18	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
177	18	134	Poli-A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
178	18	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
179	18	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
180	18	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras procesadas <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencia de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>
181	18	114	60 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
182	18	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
183	19	122	Poli-G (6); 66 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
184	19	139	64 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
185	19	131	67 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
186	19	141	59 % de GC; Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
187	19	121	Poli-C (5); 72 % de GC; Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
188	19	138	58 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
189	19	123	64 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
190	19	138	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
191	20	117	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
192	22	136	Poli-A (7)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
193	22	122	Poli-A (5); Poli-C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado <sup>1</sup>	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras procesadas <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausencias de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencias de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>	N.º total de ausencias de llamadas <sup>3</sup>	N.º total de llamadas incorrectas <sup>4</sup>	% de llamadas correctas <sup>5</sup>
194	22	122	62 % GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
195	22	119	66 % de GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

<sup>1</sup> “Fragmento analizado” se refiere al tamaño de la región genómica secuenciada en bases, sin incluir cebadores específicos según el objetivo.

<sup>2</sup> El número de muestras se calcula a partir de 9 experimentos de 15 muestras (11 muestras procesadas una vez y 2 procesadas dos veces).

<sup>3</sup> El número total de ausencias de llamadas es el número combinado de ausencias de llamadas obtenido para los 45 experimentos mediante el análisis del amplicón específico con un instrumento MiSeqDx especificado.

<sup>4</sup> El número total de llamadas incorrectas es el número combinado de llamadas incorrectas obtenido para los 45 experimentos mediante el análisis del amplicón específico con un instrumento MiSeqDx especificado.

<sup>5</sup> El porcentaje de llamadas correctas es igual al índice de llamadas correctas de todas las bases del amplicón, donde la llamada correcta de las SNV (variantes de nucleótido único) o inserciones y deleciones se basa en la base de datos de referencia bien definida, y la llamada correcta de las bases en el resto de la secuenciación del amplicón se basa en la comparación con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano. Esta columna puede tener más de un resultado esperado para un amplicón dado si se espera que algunas de las muestras contengan una inserción o deleción y otras no, por ejemplo, el amplicón 9.

<sup>6</sup> El amplicón 1 presentó un número de bases cuyo genotipo no se pudo llamar: 12 bases en 1/9 experimentos en NA12881; 1 base en 2/9 experimentos y 3 bases en 1/9 experimentos en NA12886; 20 bases en 1/9 experimentos y 26 bases en 1/9 experimentos en NA12888. Esto se debe a una cobertura baja en bases con ausencia de llamadas de dichos experimentos, donde la profundidad de la secuenciación media fue de 33,2, con un mínimo de 21 y un máximo de 52.

<sup>7</sup> Cuando no se incluyen ausencias de llamadas en el cálculo, el índice de llamadas correctas es del 100 %.

<sup>8</sup> El amplicón 9 incluye un experimento homopolimérico de 14 bases A de acuerdo con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano. Sin embargo, la información de referencia bien definida para 7 de 13 muestras tiene 13 bases A en este experimento homopolimérico. En estas siete muestras, esta deleción de un par de bases se llama falso negativo y, asimismo, falsos negativos reproducibles en los nueve experimentos.

<sup>9</sup> El amplicón 95 incluye un experimento homopolimérico de 14 bases A de acuerdo con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano. Sin embargo, la información de referencia bien definida para 13 de 13 muestras tiene 15 bases A en este experimento homopolimérico. En estas 13 muestras, esta inserción de un par de bases no se llama de forma reproducible al 100 % (es decir, es un falso negativo).

Los resultados del estudio 1 de reproducibilidad de cada muestra se presentan como suma de los nueve experimentos en una columna. Los resultados mostrados pertenecen únicamente a los resultados de las inserciones/delecciones y las variantes de nucleótido único frente a la secuencia de la base de datos de referencia de tres experimentos en tres instrumentos. Este análisis demostró que los resultados de las variantes eran reproducibles en nueve experimentos de estas muestras.

**Tabla 6** Resumen de los resultados de reproducibilidad de la plataforma MiSeqDx de 13 muestras bien definidas

N.º de ADN	ID de muestra de ADN	N.º de experimentos por muestra	N.º de variantes de nucleótido único	Variantes de nucleótido único			N.º de inserciones y delecciones	Inserciones/delecciones		
				N.º de llamadas correctas	N.º de falsos positivos <sup>1</sup>	N.º de falsos negativos <sup>2</sup>		N.º de llamadas correctas	N.º de falsos positivos <sup>1</sup>	N.º de falsos negativos <sup>2</sup>
1	NA12877 <sup>3</sup>	18	16	16	0	0	3	1	0	2
2	NA12878 <sup>3</sup>	18	17	17	0	0	2	0	0	2
3	NA12879	9	18	18	0	0	2	1	0	1
4	NA12880	9	17	17	0	0	3	1	0	2
5	NA12881	9	19	19	0	0	3	1	0	2
6	NA12882	9	15	15	0	0	1	0	0	1
7	NA12883	9	22	22	0	0	2	1	0	1
8	NA12884	9	19	19	0	0	2	1	0	1
9	NA12885	9	17	17	0	0	2	0	0	2
10	NA12886	9	19	19	0	0	3	1	0	2
11	NA12887	9	18	18	0	0	1	0	0	1
12	NA12888	9	22	22	0	0	2	1	0	1
13	NA12893	9	17	17	0	0	3	1	0	2

<sup>1</sup> Falso positivo = Variante llamada por el experimento de secuenciación de MiSeqDx que no se encuentra en la base de datos de referencia.

<sup>2</sup> Falso negativo = Variante que se encuentra en la base de datos de referencia y no se llamó en el experimento de secuenciación de MiSeqDx.

<sup>3</sup> Las muestras NA12877 y NA12878 se analizaron por duplicado. Las muestras duplicadas arrojaron resultados idénticos.

## Estudio 2

En un estudio de reproducibilidad en varios centros realizado con un ensayo típico, el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina, se incluyó un subconjunto de variaciones genéticas de *CFTR* de interés clínico analizado con el software MiSeq Reporter mediante el flujo de trabajo de secuenciación selectiva de ADN de la plataforma MiSeqDx. En el estudio a ciegas, se utilizaron tres centros de ensayo y se emplearon dos operadores en cada uno de ellos. Cada uno de los operadores de cada centro comprobó dos paneles bien definidos de 46 muestras cada uno para un total de 810 llamadas por centro. Los paneles contenían una mezcla de ADN genómico de estirpes celulares con variaciones conocidas en el gen de la *CFTR*, así como sangre desleucocitada con estirpes celulares con variantes conocidas en el gen de la *CFTR*. Las muestras de sangre se proporcionaron para permitir la incorporación de los pasos de extracción utilizados en la preparación de ADN que sirve como la entrada principal del flujo de trabajo de ensayo. El índice muestra de paso, definido como el número de muestras que superan los criterios de control de calidad en el primer intento, fue del 99,88 %. Los resultados de todas las pruebas se basan en la prueba inicial.

Tabla 7 Resumen de los resultados del estudio de reproducibilidad realizado con un ensayo típico de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx

Panel	Nº de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			Nº de llamadas incorrectas	Nº de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4 <sup>1</sup>	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 <sup>1</sup>	100	100	100
A	5 <sup>2</sup>	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9 <sup>3</sup>	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92
A	10 <sup>3</sup>	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92

Panel	Nº de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			Nº de llamadas incorrectas	Nº de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C ausente	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/(TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Nº de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			Nº de llamadas incorrectas	Nº de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/(TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100



Panel	Nº de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			Nº de llamadas incorrectas	Nº de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
B	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	59	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Nº de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			Nº de llamadas incorrectas	Nº de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 <sup>4</sup>	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75 <sup>2</sup>	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Nº de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			Nº de llamadas incorrectas	Nº de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 <sup>4</sup>	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Total				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

- <sup>1</sup> La posición en estado natural correspondiente a la variante N1303K de una duplicación provocó una ausencia de llamada debida a una cobertura insuficiente.
- <sup>2</sup> Un duplicado de las muestras 5 y 75 presentó un índice de llamada del 0 %. Una investigación más detallada indica que es posible que no se hayan añadido las muestras a la placa de muestras antes de la preparación de la biblioteca, ya que los volúmenes de muestra que quedaban en los tubos eran homogéneos y no se tuvo que eliminar ninguna cantidad de volumen.
- <sup>3</sup> Las pruebas indican que el operador probablemente alternó las muestras 9 y 10 antes de la preparación de la biblioteca.
- <sup>4</sup> La posición en estado natural correspondiente a la variante M1V de una duplicación de cada una de las dos muestras provocó una ausencia de llamada debida a una cobertura insuficiente.

## Extracción de ADN

Se evaluaron tres métodos de extracción distintos, extracción de bolas magnéticas, precipitación por alcohol y aislamiento de la columna de filtrado de silicio, mediante el uso de muestras de sangre total con K<sub>2</sub>EDTA. Se utilizaron 14 muestras de sangre únicas en el estudio, lo que representaba un rango de genotipos de un gen representativo. Dos operadores diferentes comprobaron independientemente los tres métodos de extracción de ADN. Cada operador llevó a cabo tres experimentos por método de extracción. Cada operador realizó cada una de las extracciones en días diferentes. La concentración de ADN y el índice de A260/A280 de las muestras de ADNg extraídas se determinaron mediante espectrometría. El tamaño de muestras total para cada método de extracción en el estudio fue de 168 (14 muestras, 2 operadores/métodos de extracción, 3 experimentos/operador y 2 duplicados/muestra de ADNg extraída).

Método de extracción	Número de muestras analizadas	Índice de llamada	Precisión <sup>1</sup>	Índice de muestras del primer paso <sup>2</sup>
Precipitación por alcohol	168	100 %	100 %	100 %
Aislamiento de la columna de filtrado de silicio	168	100 %	100 %	100 %
Extracción de bolas magnéticas	168	100 %	100 %	100 %

<sup>1</sup>Precisión: Coincidencia de porcentajes con un método de prueba de referencia (secuenciación bidireccional de Sanger) calculada para aquellas posiciones de las bases que reciben una llamada de bases.

<sup>2</sup>Índice de muestras del primer paso: Número de muestras que satisfacen el índice de llamada especificado la primera vez que se procesan (es decir, no requieren un nuevo experimento ni un procesamiento adicional). Se representa como el porcentaje del número total de muestras procesadas durante un único experimento de secuenciación de MiSeqDx.

## Entrada de ADN

El rango de entrada de ADN de la plataforma MiSeqDx se evaluó llevando a cabo un estudio de dilución en serie con 14 muestras de ADN representativas que contenían 16 variantes monogénicas únicas. Cada muestra se evaluó por duplicado en nueve niveles de entrada de ADN que oscilaban entre 1250 ng y 1 ng (1250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng y 1 ng). Para la determinación de la precisión, se compararon genotipos de muestra con datos de secuenciación bidireccional de Sanger. Los niveles 1250 ng y 25 ng se establecieron como el límite superior e inferior para la entrada de ADN respectivamente, ya que arrojaron un índice de muestra de primer paso del 95 % o superior, sin llamadas incorrectas (100 % de precisión y de índice de llamada).

Las entradas de ADN de 1250 ng, 250 ng y 100 ng se volvieron a analizar con cuatro muestras de ADN representativas y 20 duplicados por nivel de entrada de ADN de cada muestra ( $n = 4 * 20 = 80$  muestras), mientras que el límite inferior de 25 ng se analizó con 14 muestras y 20 duplicados de cada muestra ( $n = 14 * 20 = 280$  muestras). La precisión y el índice de muestra de primer paso fueron del 100 % en todos los niveles de entrada de ADN y los índices de llamada de muestras fueron superiores al 99 %.

## Sustancias interferentes

Para evaluar el impacto de las sustancias interferentes en la plataforma MiSeqDx, se utilizó un ensayo típico diseñado para buscar un solo gen en 11 529 bases en presencia y ausencia de posibles sustancias interferentes. En el estudio, se utilizaron ocho muestras de sangre total que representaban ocho genotipos únicos. Se analizaron cuatro sustancias interferentes endógenas (bilirrubina, colesterol, hemoglobina y triglicéridos) añadiéndolas a las muestras de sangre antes de la extracción de ADN. Para evaluar la interferencia resultante de la extracción de sangre (extracción breve), se añadió EDTA a las muestras de sangre en dos concentraciones. En la tabla siguiente se muestran los límites de concentración de cada sustancia. Asimismo, para evaluar la interferencia resultante de la preparación de muestras, se añadió tampón de lavado al 15 % a ocho ADN genómicos purificados. Se consiguió un índice de llamada del 100 % con todas las muestras analizadas, así como una reproducibilidad del 100 % en las llamadas de genotipo entre muestras en presencia y ausencia de sustancias interferentes.

Sustancia de prueba	Número total de duplicados	Concentración comprobada en sangre (límite superior)	Concentración comprobada en sangre (límite inferior)	Índice de llamada
Bilirrubina	16	684 µmol/l	137 µmol/l	100 %
Colesterol	16	13 mmol/l	2,6 mmol/l	100 %
Hemoglobina	16	2 g/l	0,4 g/l	100 %
Triglicéridos	16	37 mmol/l	7,4 mmol/l	100 %
EDTA	16	7 mg/ml	2,8 mg/ml	100 %

## Indexación de muestras

Los cebadores de índice de muestras se utilizan en el kit para asignar un código de barras único a cada muestra de ADN, lo que permite agrupar varias muestras en un solo experimento de secuenciación.

Se comprobó un total de 96 índices de muestras mediante un ensayo típico diseñado para buscar un solo gen en 11 529 bases con ocho muestras de ADN únicas para verificar la capacidad del ensayo de realizar una llamada de genotipado homogénea para una muestra determinada en combinaciones de cebadores de índice distintas. Cada muestra se comprobó con 12 combinaciones de cebadores de índice distintas. Se comprobaron 48 combinaciones de índices en un experimento de secuenciación. Se compararon los resultados de las muestras con los datos de secuenciación bidireccional de Sanger de todas las posiciones y variantes. La reproducibilidad y la precisión registradas fueron del 100 % en todas las combinaciones de cebadores de índice/muestras.

## Patentes y marcas registradas

Este documento y su contenido son propiedad 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 comunicará, divulgará ni reproducirá 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 ni similares derechos de terceros.

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

SI NO SE LEE COMPLETAMENTE EL DOCUMENTO Y NO SE SIGUEN EXPRESAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES DESCRITAS EN ESTE, PODRÍAN PRODUCIRSE DAÑOS EN EL PRODUCTO, LESIONES A LAS PERSONAS, INCLUIDOS LOS USUARIOS Y OTROS Y DAÑOS EN OTRA PROPIEDAD.

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

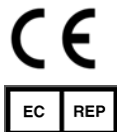
© 2017 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Illumina, MiSeq, MiSeqDx, el color naranja calabaza y el diseño de las bases de streaming son marcas comerciales de Illumina, Inc. o sus afiliados en EE. UU. u otros países. Todos los demás nombres, logotipos y marcas comerciales son propiedad de sus respectivos dueños.

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



Illumina Cambridge Limited  
Chesterford Research Park, Little  
Chesterford  
Saffron Walden, CB10 1XL  
REINO UNIDO



Patrocinador australiano:  
Illumina Australia  
1 International Court  
Scoresby, Victoria, 3179  
Australia

## Etiquetado de productos

La referencia completa de los símbolos que pueden aparecer en el etiquetado y el embalaje de los productos está disponible en PDF y puede descargarse del sitio web. Vaya a [support.illumina.com](http://support.illumina.com), seleccione un producto y, a continuación, seleccione Documents & Literature (Documentación y literatura).