

Instrucciones de uso para instrumentos con MOS v4

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO. SOLO PARA EXPORTACIÓN.

Uso previsto

El instrumento MiSeqDx se ha concebido para la secuenciación selectiva de librerías de ADN formadas a partir de ADN genómico humano que se ha extraído de sangre completa periférica o de tejido fijado en formol y embebido en parafina (FFPE, Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded) cuando se utiliza con los ensayos de diagnóstico *in vitro* (DIV) llevados a cabo en el instrumento. El instrumento MiSeqDx no está indicado para la secuenciación de genoma completo o *de novo*. El instrumento MiSeqDx se debe utilizar con un software de análisis y reactivos de DIV registrados y catalogados, autorizados o aprobados.

Principios del procedimiento

MiSeqDx de Illumina se ha concebido para la resecuenciación selectiva de ADN humano con consumibles para secuenciación de Illumina y librerías que se han preparado a partir de ADN genómico humano extraído de sangre completa periférica o de tejido FFPE con reactivos de DIV registrados y catalogados, autorizados o aprobados. Para preparar las librerías se amplifican los objetivos, se añaden los índices de muestras y se capturan las secuencias. 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). La química de SBS utiliza un método basado en terminadores reversibles para detectar bases de nucleótidos únicos a medida que se incorporan a las cadenas de ADN en crecimiento. El software Real-Time Analysis (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 análisis secundario que se lleva a cabo en el instrumento MiSeqDx procesa las llamadas de bases.

El procesamiento incluye normalmente el demultiplexado, la generación del archivo FASTQ, la alineación, las llamadas de variantes y la generación de archivos en formato de llamada de variantes (VCF, Variant Call Format) que contienen información sobre las variantes que se encuentran en posiciones específicas en un genoma de referencia. El MiSeqDx usa módulos de análisis secundarios diferentes según el flujo de trabajo.

Configuración de doble arranque

La configuración de doble arranque incluye el hardware, el software y los procedimientos para la instalación que permiten que el instrumento MiSeqDx lleve a cabo los ensayos de secuenciación tanto de diagnóstico *in vitro* (DIV) como de uso exclusivo en investigación (RUO, Research Use Only). La configuración de doble arranque permite que el usuario pueda alternar entre el modo de diagnóstico y el modo de investigación del

instrumento. Las identificaciones de radiofrecuencia (RFID, Radio-Frequency Identification) que presentan los consumibles para secuenciación evita que los reactivos de secuenciación de RUO se utilicen en experimentos de secuenciación de diagnóstico.

Limitaciones del procedimiento

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Los resultados que aparecen en el etiquetado se obtuvieron usando paneles de ensayos representativos que empleaban sangre completa periférica o estirpes celulares para determinar el rendimiento de la estirpe germinal y los tejidos FFPE o las estirpes celulares FFPE para el rendimiento somático con los reactivos y los módulos de software descritos. Los módulos Germline Variant (variante germinal) y Somatic Variant (variante somática) se desarrollaron con el fin de evaluar el rendimiento con los ensayos representativos. Las características de rendimiento se facilitan con fines meramente informativos. Las pruebas de validación que se presentan tienen el único fin de servir como ejemplo de las funciones generales del instrumento y en ningún caso determinan las funciones del instrumento o su idoneidad respecto a cualquier tesis en concreto. Todas las pruebas de diagnóstico que se han desarrollado para utilizar con el instrumento deberán validarse por completo para todos los aspectos relacionados con el rendimiento.
- Este producto ofrece lo siguiente:
 - Rendimiento de secuenciación: ≥ 5 Gb a una longitud de lectura de 2×150 pb
 - Lecturas que superan el filtro: ≥ 15 millones a una longitud de lectura de 2×150 pb
 - Bases por encima de Q30 ≥ 80 % a una longitud de lectura de 2×150 pb.
Un 80 % o más de las 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 %.
- El instrumento MiSeqDx se ha validado únicamente para la secuenciación de librerías de ADN humano que se han extraído de sangre completa periférica o de tejido FFPE. No es aconsejable utilizar en este instrumento librerías que se hayan generado a partir de otros tipos de muestras para llevar a cabo diagnósticos *in vitro*. No se ha determinado el rendimiento de este instrumento en el caso de la secuenciación de ácidos nucleicos microbianos o víricos que proceden de muestras clínicas.
- MiSeqDx se ha diseñado para el uso en diagnóstico *in vitro* con ensayos o reactivos que se hayan registrado y catalogado, autorizado o aprobado. Las limitaciones de los reactivos y las características de rendimiento que se describen en estas instrucciones de uso se basan en los ensayos representativos y los módulos de software. Para obtener más información sobre los ensayos de DIV, su uso previsto, las variantes detectadas y el tipo de muestra, consulte las instrucciones de uso del ensayo correspondiente.
- El software del ensayo no alineará el contenido de indel (inserciones, deleciones o combinaciones de ambas) cuya longitud sea superior a los 25 pb. Por lo tanto, el software del ensayo no detectará indels con una longitud superior a 25 pb.

- El sistema se ha validado para detectar variantes de nucleótido único (SNV, Single Nucleotide Variants) con un máximo de deleciones de 25 pb y un máximo de inserciones de 24 pb siempre que se utilice con el software de los módulos Germline y Somatic Variant (variante germinal y somática). En las llamadas de variantes somáticas se detectaron deleciones de 25 pb e inserciones de 18 pb con una frecuencia de variantes de 0,05.
- Es posible que el software del ensayo no alinee las lecturas de amplicones que contienen una cantidad excesiva de variantes y, en consecuencia, se catalogará la región como de estado natural. El contenido excesivo incluye:
 - Lecturas que contienen más de tres indels.
 - Lecturas cuya longitud es de, al menos, 30 pb y cuyo contenido de SNV es superior al 4 % de la longitud total del amplicón objetivo (sin tener en cuenta las regiones de sonda)
 - Lecturas cuya longitud es menor a los 30 pb y cuyo contenido de SNV es superior al 10 % de la longitud total del amplicón (incluidas las regiones de sonda).
- Es posible que las variantes de mayor tamaño, incluidas las variantes de nucleótidos múltiples (MNV, Multi-Nucleotide Variants) y los indels de gran tamaño, aparezcan en el archivo VCF de resultados por separado como variantes de menor tamaño.
- Cuando se cubren dos amplicones en la placa, es posible que las variantes de deleción se omitan o queden filtradas si la longitud de la deleción es mayor o igual que la región de solapamiento entre los amplicones de la placa.
- El sistema no puede detectar indels si son directamente adyacentes a un cebador y no existe solapamiento de amplicones. Con respecto a las regiones con amplicones solapados, el ensayo no puede detectar deleciones cuando la región de solapamiento es más pequeña que el tamaño de la deleción que se desea detectar. Por ejemplo, si la región de solapamiento entre dos amplicones adyacentes tiene dos (2) bases, el ensayo no puede detectar deleciones que incluyan esas dos bases. Una deleción de base individual en cualquiera de esas dos bases se puede detectar.
- Como con cualquier flujo de trabajo de preparación de librerías basado en hibridación, los polimorfismos, las mutaciones, las inserciones o las deleciones subyacentes en regiones de unión de oligonucleótidos pueden afectar a los alelos que se comprueban. En consecuencia, las llamadas que se han realizado durante la secuenciación también se pueden ver afectadas. Por ejemplo:
 - Una variante en fase que contiene una variante en la región del cebador es posible que no se amplifique, lo que conllevaría un falso negativo.
 - Es posible que las variantes que se sitúan en la región del cebador impidan la amplificación del alelo de referencia, lo que conllevaría una llamada de variantes homocigóticas incorrecta.
 - Las variantes de indel que se encuentran en la región del cebador pueden provocar un falso positivo en la llamada en la parte final de la lectura de las posiciones adyacentes a un cebador.
- Los indels pueden quedar filtrados a causa de cortes en la cadena si están situados en la parte final de una lectura y se han truncado levemente durante la alineación.
- No se han validado las MNV de menor tamaño.

- No se han validado las variantes de números de copias o variantes estructurales, tales como las fusiones o las translocaciones.
- Limitaciones específicas de la variante germinal:
 - El sistema MiSeqDx que utiliza el módulo Germline Variant (variante germinal) se ha concebido para ofrecer resultados cualitativos en lo que se refiere a las llamadas de variantes germinales (es decir, homocigóticas, heterocigóticas y sin mutaciones).
 - Para utilizar el módulo Germline Variant (variante germinal) es necesaria una cobertura mínima de 150x por amplicón para que la llamada de variantes sea precisa. La cantidad de muestras y el número total de bases que se van a estudiar influirán en la cobertura. El contenido de GC, así como otros contenidos genómicos, también afectan a la cobertura.
 - La variación en el número de copias puede influir en la identificación de una variante como homocigótica o heterocigótica.
 - Las variantes que se encuentran en un contexto repetitivo determinado se filtran en los archivos VCF. El filtro RMxN para las repeticiones se usa para filtrar variantes en caso de que la secuencia de la variante aparezca varias veces, en parte o en su totalidad, en el genoma de referencia adyacente a la posición de la variante. En el caso de las llamadas de variante germinal, es necesario que existan al menos nueve repeticiones en la referencia para que se filtre la variante y únicamente se tienen en cuenta las repeticiones con una longitud de hasta 5 pb (R5x9).
- Limitaciones específicas de la variante somática:
 - El sistema MiSeqDx que utiliza el módulo Somatic Variant (variante somática) se ha concebido para ofrecer resultados cualitativos en lo que se refiere a las llamadas de variantes somáticas (es decir, la presencia de una variante somática con una frecuencia de variante mayor o igual a 0,026 con un límite de detección de 0,05).
 - Para utilizar el módulo Somatic Variant (variante somática) es necesaria una cobertura mínima por amplicón de 450x por grupo de oligonucleótidos para que la llamada de variantes sea precisa. La cantidad de muestras y el número total de bases que se van a estudiar influirán en la cobertura. El contenido de GC, así como otros contenidos genómicos, también afectan a la cobertura.
 - Las variantes que se encuentran en un contexto repetitivo determinado se filtran en los archivos VCF. El filtro RMxN para las repeticiones se utiliza para filtrar variantes en caso de que la secuencia de la variante aparezca varias veces, en parte o en su totalidad, en el genoma de referencia adyacente a la posición de la variante. En el caso de las llamadas de variante somática, es necesario que existan al menos seis repeticiones en la referencia para que se filtre la variante y únicamente se tienen en cuenta las repeticiones con una longitud de hasta 3 pb (R3x6).
 - El módulo Somatic Variant (Variante somática) no es capaz de diferenciar entre las variantes germinales y las variantes somáticas. Aunque el módulo se ha diseñado para detectar las variantes dentro de un espectro de frecuencias de variantes, 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.

Componentes del producto

El Illumina MiSeqDx consta de lo siguiente:

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

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

Aplicación de software	Función	Descripción
MiSeq Operating Software (MOS)	Controla el funcionamiento del instrumento	La aplicación de software MOS gestiona el funcionamiento del instrumento durante la secuenciación y genera imágenes para que las use el software Real-Time Analysis (RTA). Para obtener más información, consulte <i>Guía de referencia de MiSeqDx Instrument para MOS v4 (n.º de documento 200010452)</i> .
Real-Time Analysis (RTA)	Realiza el análisis principal	La aplicación de software RTA convierte las imágenes que genera MOS de cada placa por ciclo del experimento de secuenciación en archivos de llamada de bases, que son entradas de los módulos de análisis de Local Run Manager. La aplicación de software de RTA no tiene interfaz de usuario.
Local Run Manager	Interfaz para la selección del módulo	El software Local Run Manager es una solución integrada en el instrumento que permite la gestión de usuarios, la ejecución de análisis secundarios y el seguimiento del estado. Para obtener más información, consulte <i>Local Run Manager v4 Software Guide for MiSeqDx (Guía del software Local Run Manager v4 para MiSeqDx) (n.º de documento 200046657)</i> .

Conservación y manipulación

Elemento	Especificación
Temperatura	Transporte y almacenamiento: De -10 °C a 40 °C (de 14 °F 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

MiSeqDx Reagent Kit v3 (n.º de catálogo 20037124)

MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (n.º de catálogo 20063860)

Consumibles que debe proporcionar el usuario

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

Consumible	Finalidad
Paños humedecidos en isopropanol al 70 % o en etanol al 70 %	Limpieza del cristal y la platina 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
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 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

Advertencias y precauciones



ADVERTENCIA

Este conjunto de reactivos contiene sustancias químicas que pueden ser peligrosas. Evite su inhalación, su ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que pueden provocar lesiones. La ventilación debe ser adecuada para la manipulación de materiales peligrosos en reactivos. Utilice un equipo de protección, incluidos gafas, guantes y batas de laboratorio adecuados para el riesgo de exposición. Manipule los reactivos usados 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 SDS en support.illumina.com/sds.html.

- Manipule todas las muestras de sangre como si contuviesen agentes infecciosos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), del virus de la hepatitis B humana (VHB) o de cualquier otro patógeno de transmisión sanguínea (precauciones universales).
- El incumplimiento de los procedimientos descritos puede provocar resultados erróneos o una reducción considerable de la calidad de las muestras.
- Utilice las precauciones habituales 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 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 poco precisos y 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, agitadoras vorticiales y centrifugadoras).
- Cuando corresponda, el emparejamiento de la muestra del índice debe coincidir exactamente con la disposición de la placa impresa. Local Run Manager rellena automáticamente los cebadores del índice asociados con los nombres de las muestras, cuando se introducen en el módulo. Es aconsejable que el usuario realice 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. Consulte el manual del usuario para obtener instrucciones acerca de la instalación.

- No utilice el MiSeqDx si se ha retirado alguno de los paneles. Poner en funcionamiento el instrumento con 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 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.
- El instrumento pesa aproximadamente 57 kg (126 libras) y podría provocar lesiones graves si se cae o se maneja de forma indebida.
- Comunique de inmediato cualquier incidente grave relacionado con este producto a Illumina y las autoridades competentes del Estado miembro en el que se encuentren el usuario o el paciente.

Instrucciones de uso

Para las siguientes instrucciones de uso del instrumento MiSeqDx se requieren los reactivos que se suministran con MiSeqDx Reagent Kit v3.

Crear experimento con Local Run Manager

Para obtener instrucciones detalladas sobre cómo crear un experimento, consulte *Local Run Manager v4 Software Guide for MiSeqDx (Guía del software Local Run Manager v4 para MiSeqDx)* (n.º de documento 200046657). y la guía del módulo Local Run Manager correspondiente al módulo de análisis que esté utilizando.

Preparación del cartucho de reactivos

Las instrucciones que se exponen a continuación describen cómo descongelar los reactivos con un baño de agua a temperatura ambiente.

1. Extraiga el cartucho de reactivo almacenado a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C.
2. Coloque el cartucho de reactivos en un baño de agua con la cantidad suficiente de agua desionizada a temperatura ambiente como para sumergir la base del cartucho de reactivos hasta la línea de agua impresa en el cartucho de reactivos. Tenga en cuenta que el agua no debe sobrepasar la línea de nivel máximo de agua.

Figura 1 Línea de agua máxima



3. Descongele el cartucho de reactivo con un baño de agua a temperatura ambiente durante un período aproximado de 60 a 90 minutos o hasta que se haya descongelado por completo.

4. Extraiga el cartucho del baño de agua y golpéelo suavemente 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 reactivos.

Inspección del cartucho de reactivos

1. Invierta el cartucho de reactivos diez veces para mezclar los reactivos descongelados y compruebe que todas las posiciones estén descongeladas.
2. Inspeccione los reactivos de las posiciones 1, 2 y 4 para asegurarse de que se hayan mezclado completamente y no presenten precipitados.

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

3. Golpee suavemente el cartucho en la mesa para reducir las burbujas de aire en los reactivos.

NOTA Los tubos del dispensador de 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 reactivos 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

Para obtener información sobre la preparación de las librerías de muestras para la secuenciación, incluidas la agrupación y la dilución de librerías, consulte la sección Instrucciones de uso que se encuentra en las instrucciones de uso de preparación de librerías.

La dilución de las librerías de muestras depende de la complejidad de los grupos de oligonucleótidos. Es necesario optimizar la densidad de grupos en MiSeqDx. La densidad de grupos óptima varía dependiendo del ensayo concreto que se utilice para la preparación de las librerías.

Carga de librerías de muestras en cartuchos

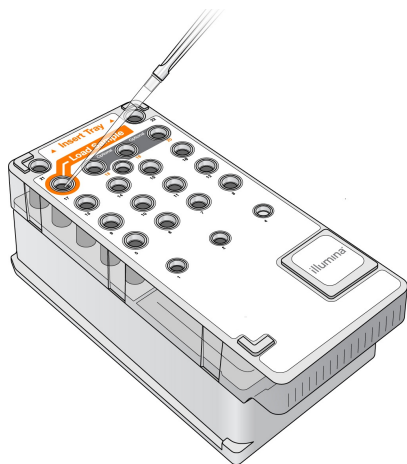
Cuando el cartucho de reactivos esté completamente descongelado y listo para su uso, estará preparado para cargar muestras en el cartucho.

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 reactivos etiquetado como **Load Samples** (Carga de muestras).

NOTA No perforo ninguna otra posición de los reactivos. Las demás posiciones de los reactivos se perforan automáticamente durante el experimento.

2. Pipetee 600 µl de las librerías de muestras de la librería de amplicones diluidos (DAL, Diluted Amplicon Library) preparadas en el depósito de **Load Samples** (Carga de muestras). Evite tocar el cierre metálico.
3. Compruebe la presencia de burbujas de aire en el depósito tras la carga de la muestra. En caso de que haya burbujas de aire, golpee suavemente el cartucho sobre la mesa para eliminar las burbujas.

Figura 2 Carga de bibliotecas



4. Continúe directamente con los pasos de configuración del experimento mediante la interfaz de MiSeq Operating Software (MOS).

Configuración del experimento

Consulte *Guía de referencia de MiSeqDx Instrument para MOS v4* (n.º de documento 200010452) para obtener instrucciones detalladas sobre la configuración del experimento.

1. Inicie sesión en MiSeqDx con su contraseña del software Local Run Manager.
2. En la pantalla Home (Inicio) del software MOS, seleccione **Sequence** (Secuenciar).
3. Elija uno de los experimentos del listado y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiendo).
Se abrirá un conjunto de pantallas de configuración del experimento en el siguiente orden: Load Flow Cell (Cargar celda de flujo), Load Reagents (Cargar reactivos), Review (Revisar) y Pre-Run check (Comprobación previa al experimento).
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. Siga las indicaciones del software para cargar la botella de MiSeqDx SBS Solution (PR2). Asegúrese de que la botella de residuos esté vacía y cargue el cartucho de reactivos.

Cuando la botella de MiSeqDx SBS Solution (PR2) y el cartucho de reactivos 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. 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

Real-Time Analysis (RTA) es un software integrado que analiza imágenes y realiza llamadas de bases, además de asignar una puntuación de calidad a cada base para cada ciclo de secuenciación. Tras haber finalizado el análisis principal, el módulo del instrumento MiSeqDx que se ha seleccionado en la sección [Crear experimento con Local Run Manager, en la página 8](#), comienza el análisis secundario. Consulte la documentación específica para ensayos de otros flujos de trabajo.

Procedimientos de control de calidad

El software MiSeqDx evalúa cada experimento, cada muestra y cada llamada de bases de acuerdo con los parámetros de control de calidad. En su caso, también se deberían evaluar los resultados esperados en los controles positivos y negativos que se incluyeron en la preparación de librerías.

Características de rendimiento

Todos los estudios se llevaron a cabo en MiSeqDx.

Los estudios de Germline utilizaron los reactivos MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay o TruSeq Custom Amplicon Kit Dx para preparar las librerías. Estos dos kits utilizan exactamente los mismos reactivos de preparación de librerías y en sus flujos de trabajo existe tan solo una diferencia: la cantidad de ciclos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (25 y 28, respectivamente). Los ciclos complementarios de PCR permiten una cantidad menor de ADN de entrada con TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (50 ng) respecto al ensayo MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay (250 ng), tal y como se demuestra en el estudio de ADN de entrada con TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Las librerías que se prepararon con MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay se secuenciaron con los correspondientes reactivos de secuenciación del kit. Las librerías que se prepararon con TruSeq Custom Amplicon Kit Dx se secuenciaron con MiSeqDx Reagent Kit v3. Estos últimos reactivos de secuenciación han incrementado el rendimiento en comparación con los de MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay.

Las pruebas abarcan los intervalos de productividad de muestras que admite MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. MiSeqDx puede admitir de 1 a 96 muestras/experimento, dependiendo del ensayo. MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro está diseñado para admitir productividades de muestras más bajas dentro de este intervalo para ensayos seleccionados.

En los estudios de Somatic se ha utilizado el kit Dx TruSeq Custom Amplicon con MiSeqDx Reagent Kit v3.

Tanto el flujo de trabajo de Germline como el de Somatic, que se han descrito para TruSeq Custom Amplicon Kit Dx con el fin de preparar las librerías para secuenciación, iban acompañados de un análisis que se llevaba a cabo mediante el módulo Germline Variant (variante germinal) o el módulo Somatic Variant (variante somática), respectivamente, teniendo en cuenta dos excepciones. Los estudios que se basaban en los paneles de mutaciones representativas de un gen (rendimiento germinal; MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay) o en el de dos genes (rendimiento somático) utilizaban flujos de trabajo y módulos de análisis específicos para el ensayo.

NOTA El contenido genómico del amplicón se resume con respecto a la cadena genómica que se secuencia. Para aquellos amplicones que se han diseñado según la cadena negativa, el contenido genómico de referencia es el complemento inverso (por ejemplo, las regiones poli-A en los amplicones de cadenas negativas corresponden a las regiones poli-T del genoma de referencia).

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

- 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.
 - $(\text{N.º de locus en los que se han detectado variantes de forma correcta en el ensayo}) / (\text{cantidad total de locus en los que existen variantes})$
Los locus en los que se han detectado variantes en el ensayo y que coinciden con el método de referencia son positivos verdaderos (TP). 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 Negatives)
- La coincidencia de porcentaje negativo (NPA, Negative Percent Agreement) se calcula como la proporción de locus que se clasifican como sin mutaciones por medio de un método de referencia y que se detectan de forma correcta en el ensayo.
 - $(\text{N.º de locus en estado natural detectados de forma correcta en el ensayo}) / (\text{cantidad total de locus en estado natural})$
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).
- 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.
 - $([\text{N.º de locus en los que se han detectado variantes de forma correcta en el ensayo}] + [\text{n.º de locus en estado natural detectados de forma correcta en el ensayo}]) / ([\text{n.º total de locus en los que existen variantes}] + [\text{n.º total de locus en estado natural}])$

- En las aplicaciones de llamadas de variantes, 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 superan uno o varios filtros de calidad). Dos estudios incluyeron de forma específica la ausencia de llamadas en sus métricas de “% de llamadas correctas” y dicha inclusión se ha tenido en cuenta en las tablas correspondientes.
- El índice de llamada se calcula teniendo en cuenta el número total de locus que han superado los filtros y dividiéndolo por el número total de posiciones secuenciadas en los cromosomas del 1 al 22. Los cromosomas X e Y quedan excluidos. Este parámetro no tiene en cuenta la coincidencia de las llamadas con el método de referencia.

Para obtener más información sobre las características de rendimiento relacionadas con los factores de preanalítica (por ejemplo, los métodos de extracción o el ADN de entrada), consulte las instrucciones de uso del método de preparación de librerías correspondiente.

Indexación de muestras

Los cebadores de índice de muestras, que se añaden en el transcurso de la preparación de librerías, asignan una secuencia única a cada muestra de ADN, lo que permite agrupar varias muestras en un solo experimento de secuenciación. La indexación de muestras se probó en los flujos de trabajo tanto germinal como somático.

Se probó un total de 96 índices de muestras usando un ensayo representativo diseñado para interrogar una serie de genes con una cobertura de 12 588 bases por cadena en todos y cada uno de los 23 cromosomas humanos con el fin de verificar la capacidad del ensayo de realizar una llamada de genotipado de manera coherente con una muestra determinada en combinaciones diferentes de cebadores de indexación. El cromosoma Y no se evaluó dado que no contenía regiones de confianza. Se probaron ocho muestras únicas con 12 combinaciones distintas de cebadores de indexación por muestra. Los resultados de las muestras del módulo de análisis de Germline se compararon con la versión 2016-01 de Platinum Genome. La PPA (en las SNV y los indels) era superior al 97 % (las llamadas con resultado de positivos verdaderos fueron de, al menos, 70 en el caso de las SNV, 38 en el de las inserciones y 36 en el de las deleciones) y la NPA era del 100 % (al menos 23 440 posiciones de referencia por combinación de índices) en cada una de las 96 combinaciones de índices. Se probó, por separado, un índice único con el fin de comprobar que la química de secuenciación de MiSeqDx Reagent Kit v3 admitía menos de ocho muestras (la química anterior que utilizaba MiSeqDx Universal Kit 1.0 se limitaba a una cantidad mínima de ocho muestras). Los valores de PPA de este índice único fueron del 98,9 % en las SNV (180 de 182), del 100 % en las inserciones (38 de 38) y del 100 % en las deleciones (46 de 46). La NPA fue del 100 % (23 856 de 23 856).

Se probaron doce duplicados (24 librerías) de una muestra con el fin de medir la precisión de los índices con variantes somáticas en frecuencias de entre 0,05 y 0,10 por medio del módulo Somatic Variant (variante somática) (se utilizaron dos combinaciones de índices por duplicado para hacer las llamadas somáticas). La PPA fue del 100 % en las SNV (64 de 64), en las inserciones (11 de 11) y en las deleciones (19 de 19). La NPA fue del 100 % (al menos 11 590 posiciones de referencia por combinación de índices) en todas las combinaciones de índices.

Arrastre de muestras

El flujo de trabajo del instrumento MiSeqDx implica procesar al mismo tiempo la preparación de librerías y la secuenciación de varias muestras, además de los controles. El estudio sobre el arrastre de muestras se llevó a cabo con el objetivo de evaluar si afectaban a los resultados de la prueba los resultados de falsos positivos, bien porque se hubieran contaminado en el transporte de un pocillo a otro durante la preparación de librerías de muestras o porque se hubieran contaminado de un experimento a otro entre experimentos de secuenciación consecutivos. Se utilizaron variantes somáticas, ya que se pueden detectar con eventos de frecuencias de alelos más bajas que las variantes germinales.

Las muestras consistían en cuatro muestras de ADN genómico de estirpes celulares y cada una contenía diferentes mutaciones de panel en un ensayo representativo de dos genes. Las muestras se eligieron de forma que una mutación en una posición de una muestra tenía una secuencia de referencia (sin mutaciones) en las otras.

El arrastre de un pocillo a otro se define como un tipo de fallo que se puede provocar durante las etapas que se procesan de forma manual (pipeteo, confusión de muestras, etc.). Con el fin de evaluar el arrastre de un pocillo de muestra a otro, se llevaron a cabo dos experimentos de prueba:

- Una disposición en damero donde se colocaban, alternativamente, una muestra con una gran cantidad de entrada de ADN genómico (ADNg) que contenía una mutación en el Gen 1 y una muestra con poca cantidad de entrada de ADNg que contenía una mutación en el Gen 2.
- Una disposición en damero donde se colocaban, alternativamente, una muestra con una gran cantidad de entrada de ADNg que contenía una mutación en el Gen 2 y una muestra con poca cantidad de entrada de ADNg que contenía una mutación en el Gen 1.

En cada experimento, se evaluó un total de 12 duplicados en busca de falsos positivos (por ejemplo, una mutación en el Gen 1 detectada en un pocillo al que se había asignado la muestra con mutación del Gen 2 o al contrario).

El arrastre de un experimento a otro se define como el tipo de fallo que puede provocar un residuo de un experimento de secuenciación previo. Con el fin de establecer si se había producido un arrastre entre experimentos de secuenciación, se prepararon y secuenciaron, de forma consecutiva en un solo instrumento MiSeqDx, dos placas que contenían, cada una, 11 duplicados de una muestra única con una gran cantidad de entrada de ADNg y una muestra en blanco con el fin de evaluar los falsos positivos. El primer experimento contenía 11 duplicados de una muestra con mutación del Gen 2 y una muestra en blanco. El segundo experimento contenía 11 duplicados de una muestra con mutación del Gen 1 y una muestra en blanco. En primer lugar, se secuenció la librería de muestras con mutación del Gen 2 y, a continuación, se llevó a cabo el experimento de secuenciación correspondiente con la librería de muestras con una mutación del Gen 1. Inmediatamente después, se repitió el experimento de secuenciación con las librerías de muestras con la mutación del Gen 2. Se establecería que ha habido un arrastre si se observase cualquier mutación del Gen 2 en el experimento que se ha llevado a cabo únicamente con la mutación del Gen 1 o a la inversa.

No se detectó ningún falso positivo (0 de 24, el 0 %) provocado por el arrastre *de un pocillo a otro*. Se observaron todas las mutaciones previstas. No se detectó ningún falso positivo (0 de 24, el 0 %) provocado por el arrastre *de un experimento a otro*. Se observaron todas las mutaciones previstas. No se detectó ningún falso positivo (0 de 48, el 0 %) provocado por el arrastre *total* (combinación de arrastre de un pocillo a otro y de arrastre de un experimento a otro).

Características de rendimiento germinal

Los estudios que se han descrito aquí han utilizado el módulo Germline Variant (variante germinal) para analizar los datos de secuenciación, excepto en el caso de aquellos estudios que empleaban el panel de un gen, en los que se utilizó un módulo específico del ensayo.

Exactitud

El estudio que se expone a continuación se llevó a cabo con el objetivo de evaluar la precisión del instrumento MiSeqDx cuando se utiliza con MiSeqDx Reagent Kit v3 y ADN de alta calidad. En este estudio, se ha empleado un ensayo representativo diseñado para interrogar una serie de genes que cubrían 12 588 bases de 23 cromosomas diferentes usando 150 amplicones. El cromosoma Y no se evaluó dado que no contenía regiones de confianza. Las 12 muestras únicas que se utilizaron en este estudio corresponden a una sola familia, dos padres y 10 niños, que varios laboratorios habían secuenciado con frecuencia usando diferentes metodologías de secuenciación. Cinco muestras pertenecen a mujeres y siete muestras a hombres. Se realizaron pruebas en cada una de las muestras por duplicado. Se determinó la precisión de las SNV, las inserciones y las deleciones comparando los datos del estudio con una base de datos de referencia bien definida. La secuencia de la base de datos de referencia (versión 2016-01 de Platinum Genome) se obtuvo a partir de la combinación de varias metodologías de secuenciación, datos públicos e información hereditaria. Las regiones genómicas de confianza se definieron teniendo en cuenta este método de referencia, a menos que se indique lo contrario. Las muestras se procesaron ocho veces en total. Las tablas que se exponen para demostrar la precisión se han basado en los datos del primer experimento.

La [Tabla 1](#) engloba 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 1 Coincidencia de los resultados de las llamadas de bases del instrumento MiSeqDx por muestra

Muestra	Media de índice de llamada	N.º total de variantes	N.º total de variantes TP	N.º total de variantes FN	N.º total de ausencia de llamadas	N.º total de llamadas TN	PPA	NPA	OPA
NA12877	>99,9	152	152	0	4	24 024	100	100	100
NA12878	>99,9	270	266	0	4	23 856	100	100	100
NA12879	>99,9	192	190	1	1	24 054	99,5	100	>99,9
NA12880	>99,9	222	220	0	6	24 052	100	100	100
NA12881	>99,9	250	247	1	2	23 862	99,6	100	>99,9
NA12882	>99,9	200	196	2	2	23 962	99,0	100	>99,9
NA12883	>99,9	226	224	0	6	23 870	100	100	100
NA12884	>99,9	228	226	1	1	23 942	99,6	100	>99,9
NA12885	>99,9	244	240	2	2	23 942	99,2	100	>99,9
NA12886	>99,9	230	228	1	1	23 888	99,6	100	>99,9
NA12888	>99,9	216	216	0	4	24 002	100	100	100
NA12893	>99,9	236	234	0	2	23 810	100	100	100

El ensayo representativo incluía 150 amplicones concebidos para cubrir un contenido genómico diverso. El contenido de GC de los amplicones oscilaba entre el 26 % y el 87 %. Los amplicones también contenían una serie de repeticiones de nucleótido único (por ejemplo, poli-A y poli-T), de dinucleótidos y de trinucleótidos. Los datos se recopilaban por amplicón [Tabla 2](#) con el objetivo de determinar el efecto del contenido genómico en el % de llamadas correctas. El % de llamadas correctas contiene las llamadas de variantes y de referencia y se sitúa por debajo del 100 %, si se producen llamadas incorrectas o ausencias de llamadas. La ausencia de llamadas se da cuando las llamadas de variantes no superan uno o varios filtros (por ejemplo, cuando la cobertura es insuficiente).

De las ocho variantes FN de la [Tabla 2](#), siete de ellas se dieron con una inserción de 1 pb en el amplicón 111, que también incluía un homopolímero de poli-A y un contenido de GC de 0,29. El otro FN (llamada incorrecta) se debió a la llamada como variante homocigótica de una SNV heterocigótica prevista en el amplicón 125 con un contenido de GC de 0,68. La frecuencia de variante SNV

fue de 0,71, valor que se encuentra por encima del umbral de 0,70 que cataloga la variante como homocigótica. El amplicón con menor % de llamadas correctas (el 98,2 %) fue el amplicón 17, que incluía repeticiones AT y un contenido de GC del 27 % y en el que se detectaron 40 ausencias de llamadas.

Tabla 2 Precisión por amplicón del instrumento MiSeqDx

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	N.º total de llamadas correctas	N.º total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	2232	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poli-A (5), poli-C (5), indel	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	2184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	2208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poli-G (5)	0,69	1944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poli-T (10), indel	0,39	1680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poli-A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	2112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	2160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	N/A	0,65	1944	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poli-A (8)	0,35	1800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Poli-T (5)	0,42	2112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poli-T (5), indel	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poli-T (5), poli-A (6), indel	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	N/A	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poli-T (5), indel	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	N/A	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Poli-A (5), poli-T (5), poli-A (9), TG(3)	0,41	2112	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1774	0	2	99,9

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	N.º total de llamadas correctas	N.º total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
22	4	2233667	2233744	78	78	Poli-A (6)	0,26	1872	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poli-G (6), poli-T (5), poli-A (5)	0,42	2328	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	N/A	0,29	1872	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Poli-A (5), indel	0,36	1488	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Poli-A (5)	0,46	1656	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Poli-A (7), indel	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	N/A	0,78	1800	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	2016	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	N/A	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poli-A (6), indel	0,3	1992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poli-T (5)	0,37	1608	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	2184	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	10	10	Poli-G (6)	0,68	2448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	2244	0	12	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Poli-T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	2352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	2280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Poli-C (6)	0,7	2064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Poli-G (5), indel	0,61	2256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poli-A (5)	0,44	2184	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	N/A	0,44	1752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	2112	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Poli-A (7), AG(4)	0,26	2088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poli-G (5), indel	0,62	2160	0	0	100

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	N.º total de llamadas correctas	N.º total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
48	7	149503875	149503965	91	91	Poli-G (6), poli-C (6), indel	0,71	2184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	N/A	0,31	1584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	2232	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	N/A	0,42	1992	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poli-G (7), CTC(4), indel	0,61	2113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poli-G (6)	0,67	2352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	1560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	N/A	0,49	2304	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1992	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Poli-C (6), indel	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poli-G (5), indel	0,47	1872	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	2184	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Poli-T (5)	0,3	1896	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poli-A (5), poli-T (5)	0,2	2160	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	2280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	N/A	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	N/A	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	N/A	0,45	2304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	N/A	0,65	2400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	1488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	N/A	0,59	2448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Poli-A (5)	0,4	1752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	N/A	0,42	2040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Poli-G (6)	0,55	2184	0	0	100

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	N.º total de llamadas correctas	N.º total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	2040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poli-A (5), CA(3), indel	0,34	2040	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	2040	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Poli-C (5), indel	0,52	2016	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Poli-A (7), AC(4)	0,33	2232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	N/A	0,49	1944	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Poli-A (6)	0,35	1704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Poli-G (5)	0,68	2280	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	N/A	0,52	1752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poli-A (5), poli-T (7), poli-A (7), indel	0,22	2112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	2136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1848	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	1608	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	N/A	0,25	1992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poli-T (5), indel	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	2184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poli-A (5)	0,41	1584	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	2256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Poli-C (5)	0,45	2304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poli-G (5), indel	0,68	2232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Poli-T (6)	0,43	2280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	N/A	0,36	2184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	N/A	0,27	1512	0	0	100

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	N.º total de llamadas correctas	N.º total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
102	16	28997904	28997998	95	95	Poli-C (5)	0,67	2280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	2088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Poli-C (5)	0,67	2496	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poli-T (5), indel	0,37	2184	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	2136	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Poli-C (5), indel	0,67	2088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	2184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	2232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poli-T (5)	0,54	2136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poli-A (13), indel (x2)	0,29	1944	7	17	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Poli-A (5)	0,34	2184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Poli-A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	Poli-T (7)	0,22	2064	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	2016	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1608	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	N/A	0,37	2184	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poli-A (6), TG(3)	0,43	1656	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poli-A (5), indel	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	N/A	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	N/A	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	N/A	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	N/A	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	N/A	0,61	2256	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1968	0	0	100

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	N.º total de llamadas correctas	N.º total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1824	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	1680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	2424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1608	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Poli-G (6)	0,73	2112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	2088	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	1584	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poli-T (6), CA(3)	0,54	2352	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	2088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poli-A (6), AG(3), indel	0,32	1656	0	0	100
139	21	46705575	46705664	90	90	Poli-T (5), poli-A (6)	0,5	2160	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	2400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	N/A	0,68	2328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	2328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	N/A	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	2208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poli-T (5)	0,26	1656	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Poli-C (5)	0,62	1656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	N/A	0,52	1704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	N/A	0,55	0	0	0	N/A
149	Y	2655519	2655609	91	0	N/A	0,48	0	0	0	N/A
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poli-A (5)	0,37	0	0	0	N/A

Las variantes que presentaron ausencia de llamadas se resumen en la [Tabla 3](#). Se enumeran en la tabla los filtros específicos cuyo resultado fue la ausencia de llamadas. La inserción en el amplicón 111 se filtró en nueve de los 16 casos y en los siete restantes se llamó como referencia, por lo que el resultado fueron los FN.

Tabla 3 Resumen de ausencias de llamadas de variantes

N.º de amplicón	Cromosoma:Posición	Variante	Contenido del amplicón correspondiente	Filtro	Variantes omitidas	Variantes previstas	Llamadas FN
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42 % de GC	R5x9 ¹	10	10	0
111	17:39589692	C > CA	Poli-A (13), 29 % de GC	R5x9	9	16	7

¹ R5x9: Repetir filtro. Una variante se filtra en caso de que aparezca varias veces, en parte o en su totalidad, en el genoma de referencia adyacente a la posición de la variante. Es necesario que existan al menos nueve repeticiones en la referencia y únicamente se tienen en cuenta las repeticiones con una longitud de hasta 5 pb.

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) de EE. UU. (v.2.19). De los 150 amplicones, 92 estaban incluidos completamente en las regiones genómicas muy fiables, 41 coincidían parcialmente y 17 no coincidían en absoluto con la secuencia del NIST. El resultado fueron 10 000 coordenadas por duplicado para llevar a cabo la comparación. Las llamadas de bases de no variantes se compararon con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano. Los resultados de exactitud se muestran en la [Tabla 4](#).

Tabla 4 Coincidencia de los resultados de llamadas de bases de la muestra NA12878 mediante el instrumento MiSeqDx con la base de datos del NIST

Muestra	N.º de amplicones	Media de índice de llamada	N.º total de variantes TP	N.º total de variantes FN	N.º total de llamadas TN	N.º total de llamadas FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19 380	0	100	100	100

Las muestras se analizaron con una mayor profundidad para hacer llamadas de inserciones y deleciones (indels) de menor tamaño ([Tabla 5](#)). En algunos casos, el indel era común entre dos o más muestras, tal y como se refleja en la columna "N.º total de duplicados de muestras con indel". Los resultados de ambos duplicados de las 12 muestras válidas se incluyen en la [Tabla 5](#). Se detectó un total de 71 indels cuyo tamaño oscilaba entre 1 y 24 pb en el caso de las inserciones y entre 1 y 25 pb en el caso de las deleciones. Se detectaron 69 inserciones y deleciones cuyo porcentaje de coincidencia positiva era del 100 % en cada uno de los casos. Una deleción (amplicón 64; deleción de 2 pb (chr10 55892600 TAC>T) no tuvo llamadas correctas porque cada una de estas variantes era una ausencia de

llamadas debido al filtro R5x9. Por lo tanto, no se pudo calcular la PPA, que excluye la ausencia de llamadas. Otra indel, inserción de 1 pb (chr17 39589692 C>CA en el amplicón 111), tampoco tuvo llamadas correctas porque nueve variantes eran una ausencia de llamadas debido al filtro R5x9 y siete eran llamadas FN.

Tabla 5 Resumen de la detección de indel con el instrumento MiSeqDx

Amplicón	Cromosoma	Posición	Tamaño del fragmento analizado	Tipo y longitud del indel del amplicón	Indel	N.º total de duplicados de muestras con indel	N.º de ausencias de llamadas	N.º total de llamadas incorrectas de indel	N.º total de llamadas correctas de indel	PPA
1	1	36450544	93	Delección de 25 pb	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	Delección de 3 pb	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	Inserción de 23 pb	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	Delección de 17 pb	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	Inserción de 5 pb	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	Inserción de 3 pb	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	90	Inserción de 7 pb	T>TTTGGTAA	14	0	0	14	100
9	2	87003972	80	Delección de 6 pb	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	87	Inserción de 5 pb	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	Inserción de 12 pb	C>CTGAAAATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	Inserción de 2 pb	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	Delección de 23 pb	TAACTTAAAATTACAAAATAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	Inserción de 9 pb	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	Delección de 1 pb	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	66	Delección de 8 pb	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	Inserción de 11 pb	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	Delección de 4 pb	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	Inserción de 8 pb	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	Delección de 21 pb	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	Delección de 3 pb	GCTT>G	14	0	0	14	100

Amplicón	Cromosoma	Posición	Tamaño del fragmento analizado	Tipo y longitud del indel del amplicón	Indel	N.º total de duplicados de muestras con indel	N.º de ausencias de llamadas	N.º total de llamadas incorrectas de indel	N.º total de llamadas correctas de indel	PPA
39	6	32986905	95	Delección de 25 pb	CTTTCAC TTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	Delección de 23 pb	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	Inserción de 1 pb	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	Delección de 4 pb	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	Inserción de 1 pb	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	Delección de 4 pb	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156476548	93	Delección de 11 pb	GAATCTGCACTT>G	12	0	0	12	100
52	8	24811064	90	Delección de 1 pb	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	Inserción de 4 pb	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	Inserción de 4 pb	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	Delección de 21 pb	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	Delección de 3 pb	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	Delección de 16 pb	AGCGTCTATAACCAAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55892600	89	Delección de 2 pb	TAC>T	10	10	0	0	N/A
68	11	30177690	70	Inserción de 2 pb	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59837721	62	Inserción de 8 pb	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100
75	11	118406328	85	Delección de 8 pb	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	Delección de 2 pb	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	Inserción de 21 pb	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	Inserción de 19 pb	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	Inserción de 4 pb	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	Delección de 20 pb	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	Delección de 22 pb	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	24	0	0	24	100

Amplición	Cromosoma	Posición	Tamaño del fragmento analizado	Tipo y longitud del indel del amplición	Indel	N.º total de duplicados de muestras con indel	N.º de ausencias de llamadas	N.º total de llamadas incorrectas de indel	N.º total de llamadas correctas de indel	PPA
90	14	58050081	81	Inserción de 4 pb	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	Delección de 16 pb	CTTGCTCTATAAACCGT>C	10	0	0	10	100
93	14	102808554	94	Delección de 5 pb	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	Delección de 6 pb	CAAAATT>C	12	0	0	12	100
96	15	77879862	95	Delección de 25 pb	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	Inserción de 3 pb	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	Inserción de 4 pb	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	Delección de 7 pb	ATTATTTC>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	Delección de 1 pb	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	Inserción de 18 pb	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	Inserción de 4 pb	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	Inserción de 1 pb	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	84	Inserción de 24 pb	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	Delección de 4 pb	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	79	Delección de 12 pb	TTTGATCTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38837054	75	Inserción de 22 pb	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	Inserción de 3 pb	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	85	Delección de 2 pb	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	70	Delección de 15 pb	TACTTGAGAACTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	101	Inserción de 5 pb	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50897361	67	Inserción de 11 pb	G>GGAATGTCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	Delección de 16 pb	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	Inserción de 11 pb	G>GATAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	Delección de 21 pb	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	Delección de 5 pb	GTTGTT>G	8	0	0	8	100

Amplicón	Cromosoma	Posición	Tamaño del fragmento analizado	Tipo y longitud del indel del amplicón	Indel	N.º total de duplicados de muestras con indel	N.º de ausencias de llamadas	N.º total de llamadas incorrectas de indel	N.º total de llamadas correctas de indel	PPA
140	22	25750814	100	Inserción de 6 pb	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	Inserción de 5 pb	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	Delección de 10 pb	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

Reproducibilidad

Se llevaron a cabo dos estudios para evaluar la reproducibilidad del instrumento MiSeqDx con estirpes celulares (estudios 1 y 2) o con sangre desleucocitada con estirpes celulares (estudio 2). El estudio 1 utilizó múltiples instrumentos. El estudio 2 tenía múltiples centros.

Estudio 1

La reproducibilidad del instrumento MiSeqDx se estableció por medio de dos instrumentos, dos operadores y dos lotes de reactivos para un total de ocho experimentos. El ensayo representativo, las muestras y el método de referencia son los mismos que se han descrito en el estudio de precisión.

Los resultados de cada instrumento se muestran por amplicón [Tabla 6](#) con el objetivo de demostrar la reproducibilidad de las llamadas en todos los instrumentos. Los % de llamadas correctas incluían tanto las llamadas incorrectas como la ausencia de llamadas (no se superaron uno o más filtros en las llamadas de variantes). Los instrumentos generaron cantidades parecidas de ausencias de llamadas y llamadas incorrectas dependiendo del amplicón en particular.

Tabla 6 Resultados de la reproducibilidad del estudio instrumento a instrumento del instrumento MiSeqDx (por amplicón)

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	Poli-A (5), poli-C (5), indel	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	8736	0	0	8736	0	0

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	8832	0	0	8832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	Poli-G (5)	0,69	7776	0	0	7776	0	0
6	1	236372039	236372108	70	70	Poli-T (10), indel	0,39	6720	0	0	6720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poli-A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	N/A	0,65	7775	1	0	7775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	Poli-A (8)	0,35	7200	0	0	7200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	Poli-T (5)	0,42	8448	0	0	8448	0	0
13	2	200796740	200796826	87	87	Poli-T (5), indel	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212245049	212245139	91	91	Poli-T (5), poli-A (6), indel	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	N/A	0,43	8928	0	0	8928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	Poli-T (5), indel	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	8761	0	167	8760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	N/A	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	6720	0	0	6720	0	0
20	3	189713161	189713248	88	88	Poli-A (5), poli-T (5), Poli-A (9), TG(3)	0,41	8448	0	0	8448	0	0

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	7096	0	8	7096	0	8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poli-A (6)	0,26	7488	0	0	7488	0	0
23	4	7780541	7780637	97	97	Poli-G (6), poli-T (5), Poli-A (5)	0,42	9312	0	0	9312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	N/A	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	Poli-A (5), indel	0,36	5952	0	0	5952	0	0
26	4	102839244	102839314	71	69	Poli-A (5)	0,46	6624	0	0	6624	0	0
27	4	164446743	164446804	62	62	Poli-A (7), indel	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	N/A	0,78	7200	0	0	7200	0	0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
30	5	41069808	41069871	64	64	N/A	0,39	6144	0	0	6144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	Poli-A (6), indel	0,3	7968	0	0	7968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	Poli-T (5)	0,37	6432	0	0	6432	0	0
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG (3)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	7200	0	0	7200	0	0
35	6	6318713	6318814	102	102	Poli-G (6)	0,68	9792	0	0	9792	0	0
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	8979	0	45	8979	0	45
38	6	32147987	32148084	98	98	Poli-T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	9408	0	0	9408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	9120	0	0	9120	0	0

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas
40	6	33408498	33408583	86	86	Poli-C (6)	0,7	8256	0	0	8256	0	0
41	6	41647401	41647495	95	94	Poli-G (5), indel	0,61	9024	0	0	9024	0	0
42	6	112435865	112435955	91	91	Poli-A (5)	0,44	8736	0	0	8736	0	0
43	7	22202076	22202148	73	73	N/A	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	8448	0	0	8448	0	0
45	7	77365735	77365821	87	87	Poli-A (7), AG(4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	Poli-G (5), indel	0,62	8550	0	90	8550	0	90
48	7	149503875	149503965	91	91	Poli-G (6), poli-C (6), indel	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	N/A	0,31	6336	0	0	6336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	N/A	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	Poli-G (7), CTC(4), indel	0,61	8452	0	92	8449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	6432	0	0	6432	0	0
54	9	103054909	103055006	98	98	Poli-G (6)	0,67	9408	0	0	9408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	N/A	0,49	9216	0	0	9216	0	0
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	7968	0	0	7968	0	0
58	9	138995345	138995441	97	97	Poli-C (6), indel	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	Poli-G (5), indel	0,47	7488	0	0	7488	0	0

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	8644	1	91	8644	1	91
61	10	27317777	27317855	79	79	Poli-T (5)	0,3	7584	0	0	7584	0	0
62	10	33018351	33018440	90	90	Poli-A (5), poli-T (5)	0,2	8640	0	0	8640	0	0
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	9120	0	0	9120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	N/A	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	N/A	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	N/A	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	N/A	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	5952	0	0	5952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	N/A	0,59	9792	0	0	9792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	Poli-A (5)	0,4	7008	0	0	7008	0	0
73	11	101347052	101347136	85	85	N/A	0,42	8160	0	0	8160	0	0
74	11	102477336	102477426	91	91	Poli-G (6)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	8160	0	0	8160	0	0
76	11	120357801	120357885	85	85	Poli-A (5), CA(3), indel	0,34	8160	0	0	8160	0	0
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	8160	0	0	8160	0	0
78	12	2834770	2834853	84	84	Poli-C (5), indel	0,52	8064	0	0	8064	0	0
79	12	26811004	26811096	93	93	Poli-A (7), AC(4)	0,33	8928	0	0	8928	0	0
80	12	30881766	30881846	81	81	N/A	0,49	7776	0	0	7776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	Poli-A (6)	0,35	6816	0	0	6816	0	0

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas
82	12	120966872	120966966	95	95	Poli-G (5)	0,68	9117	3	0	9119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	N/A	0,52	7008	0	0	7008	0	0
84	13	25816961	25817049	89	88	Poli-A (5), poli-T (7), poli-A (7), indel	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	7392	0	0	7392	0	0
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA (3)	0,39	6432	0	0	6432	0	0
88	14	39517884	39517966	83	83	N/A	0,25	7968	0	0	7968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	Poli-T (5), indel	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	7776	0	0	7776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	8736	0	0	8736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	Poli-A (5)	0,41	6336	0	0	6336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	9024	0	0	9024	0	0
94	15	43170751	43170848	98	96	Poli-C (5)	0,45	9216	0	0	9216	0	0
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	Poli-G (5), indel	0,68	8928	0	0	8926	2	0
97	15	81625334	81625428	95	95	Poli-T (6)	0,43	9120	0	0	9120	0	0
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	N/A	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	N/A	0,27	6048	0	0	6048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	Poli-C (5)	0,67	9120	0	0	9120	0	0
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	8352	0	0	8352	0	0

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas
104	16	57954406	57954509	104	104	Poli-C (5)	0,67	9984	0	0	9984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	Poli-T (5), indel	0,37	8736	0	0	8736	0	0
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	8544	0	0	8544	0	0
107	17	3594191	3594277	87	87	Poli-C (5), indel	0,67	8347	0	5	8347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	8928	0	0	8928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	Poli-T (5)	0,54	8544	0	0	8544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	Poli-A (13), indel (x2)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	Poli-A (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0
113	17	45438866	45438957	92	92	Poli-A (7), AT(3), AT (4), AT(4), indel	0,26	8832	0	0	8832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	7546	0	38	7547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	Poli-T (7)	0,22	8256	0	0	8256	0	0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	6432	0	0	6432	0	0
118	18	6980478	6980568	91	91	N/A	0,37	8736	0	0	8736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	Poli-A (6), TG(3)	0,43	6624	0	0	6624	0	0
120	18	38836999	38837073	75	75	Poli-A (5), indel	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	7776	0	0	7776	0	0

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	N/A	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	N/A	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	N/A	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	N/A	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	N/A	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	7296	0	0	7296	0	0
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	6432	0	0	6432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	Poli-G (6)	0,73	8360	0	88	8360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	6336	0	0	6336	0	0
136	21	33694176	33694273	98	98	Poli-T (6), CA(3)	0,54	9408	0	0	9408	0	0
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	Poli-A (6), AG(3), indel	0,32	6603	0	21	6601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	Poli-T (5), poli-A (6)	0,5	8640	0	0	8640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	N/A	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	N/A	0,6	9504	0	0	9504	0	0

Amplición	Cromosoma	Inicio del amplición	Final del amplición	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplición	Contenido de GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	8832	0	0	8832	0	0
145	X	15870424	15870492	69	69	Poli-T (5)	0,26	6624	0	0	6624	0	0
146	X	135288543	135288611	69	69	Poli-C (5)	0,62	6624	0	0	6624	0	0
147	X	135290777	135290847	71	71	N/A	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	N/A	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2655519	2655609	91	0	N/A	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poli-A (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Los resultados del estudio de reproducibilidad se analizaron por operador mediante la frecuencia de variante [Tabla 7](#). El análisis demostró que las frecuencias de variantes eran coherentes en el caso de todos los operadores. Se expone el promedio de frecuencias de variantes con una desviación estándar de +/- 1.

Tabla 7 Resultados operador a operador del instrumento MiSeqDx

Rango de frecuencia de variantes	N.º de variantes únicas	N.º total de variantes analizadas por el Operador 1	N.º total de variantes analizadas por el Operador 2	Promedio (desviación estándar) de la frecuencia de variante comunicada por el Operador 1	Promedio (desviación estándar) de la frecuencia de variante comunicada por el Operador 2
Homocigótica (0,70-1,00)	2424	2424	2422	0,94 +/- 0,07	0,96 +/- 0,05
Heterocigótica (0,20-0,70)	8240	8132	8128	0,48 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

Los resultados del estudio de reproducibilidad de cada muestra se presentan como suma de los ocho experimentos [Tabla 8](#). La detección de cada tipo de variante se evalúa de forma independiente: SNV, inserciones y deleciones. Quedan excluidas las posiciones de referencia. Este análisis demostró que los resultados de las variantes eran reproducibles en todas las muestras.

Tabla 8 Coincidencia de los resultados de las llamadas de bases del instrumento MiSeqDx por muestra

Muestra	SNV				Inserciones				Deleciones			
	N.º total	N.º total de TP	N.º total de FP	N.º total de FN	N.º total	N.º total de TP	N.º total de FP	N.º total de FN	N.º total	N.º total de TP	N.º total de FP	N.º total de FN
NA12877	592	592	0	0	336	336	0	0	288	288	0	0
NA12878	1456	1456	0	0	320	304	0	0	384	368	0	0
NA12879	912	912	0	0	336	320	0	2	288	288	0	0
NA12880	1072	1071	0	1	384	384	0	0	320	304	0	0
NA12881	1248	1247	0	1	384	368	0	0	368	368	0	0
NA12882	944	943	0	1	352	336	0	4	304	288	0	0
NA12883	1088	1087	0	1	368	368	0	0	352	335	0	1
NA12884	1088	1088	0	0	400	384	0	5	336	336	0	0
NA12885	1200	1189	0	7	400	382	0	4	352	336	0	0
NA12886	1104	1102	0	2	368	352	0	3	368	368	0	0
NA12888	1056	1054	0	2	368	368	0	0	304	304	0	0
NA12893	1168	1168	0	0	352	336	0	1	368	368	0	0

Los datos obtenidos en los ocho experimentos que se llevaron a cabo en este estudio de reproducibilidad corroboran la afirmación de que el instrumento MiSeqDx puede secuenciar de forma coherente:

- Contenido de GC ≥ 19 % (se llamaron correctamente todas las bases en 192 de los 192 amplicones secuenciados con el 19 % de contenido de GC y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 1,1 %)
- Contenido de GC ≤ 78 % (se llamaron correctamente todas las bases en 192 de los 192 amplicones secuenciados con el 78 % de contenido de GC y no hubo ninguna ausencia de llamadas)
- Longitudes de poli-A ≤ 8 (se llamó correctamente la repetición de poli-A de ocho nucleótidos en 192 de los 192 amplicones secuenciados que contenían poli-A = 8)
- Longitudes de poli-T ≤ 10 (se llamó correctamente la repetición de poli-T de 10 nucleótidos en 192 de los 192 amplicones secuenciados que contenían poli-T = 10)
- Longitudes de poli-G ≤ 7 (se llamó correctamente la repetición de poli-G de siete nucleótidos en 192 de los 192 amplicones secuenciados que contenían poli-G = 7)
- Longitudes de poli-C ≤ 6 (se llamó correctamente la repetición de poli-C de seis nucleótidos en 576 de los 576 amplicones secuenciados que contenían poli-C = 6)

- Longitudes de repetición de dinucleótido $\leq 11 \times$ (se llamaron correctamente todas las bases en 192 de los 192 amplicones secuenciados con repetición de dinucleótido de $11 \times$ y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,5 %)
- Longitudes de repetición de trinucleótido $\leq 5 \times$ (se llamaron correctamente todas las bases en 192 de los 192 amplicones secuenciados con repetición de trinucleótido de $5 \times$ y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,5 %)
- Inserciones de 24 bases o menos y deleciones de 25 bases o menos
 - Se llamaron correctamente inserciones de 24 bases en 192 muestras de las 192 en total
 - Se llamaron correctamente deleciones de 25 bases en 223 muestras de las 224 y se detectó una llamada incorrecta en una muestra

Estudio 2

En un estudio de reproducibilidad en varios centros realizado con un ensayo representativo, MiSeqDx Cystic Fibrosis 139 Variant Assay 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 sin enmascaramiento, se utilizaron tres centros de ensayo y se emplearon dos operadores en cada uno de ellos. Cada uno de los operadores de cada centro probó 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 las etapas de extracción utilizadas en la preparación de ADNg que sirve como entrada principal del flujo de trabajo de ensayo. El índice de 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 9 Resumen de los resultados del estudio de reproducibilidad realizado con MiSeqDx Cystic Fibrosis 139 Variant Assay representativo

Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias 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

Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro	Centro	Centro	Centro	Centro	Centro					
					1	2	3	1	2	3					
A	2	1812-1G>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 ¹	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 ¹	100	100	100
A	5 ²	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 ²	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 ³	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ³	0	97,22	99,96	99,92
A	10 ³	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ³	0	97,22	99,96	99,92
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

Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro	Centro	Centro	Centro	Centro	Centro					
					1	2	3	1	2	3					
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
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/A	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/A	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

Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro	Centro	Centro	Centro	Centro	Centro					
					1	2	3	1	2	3					
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	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
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/A	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

Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro	Centro	Centro	Centro	Centro	Centro					
					1	2	3	1	2	3					
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/A	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	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/A	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	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/A	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/A	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 ⁴	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 ⁴	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro	Centro	Centro	Centro	Centro	Centro					
					1	2	3	1	2	3					
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75 ²	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 ²	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	1812-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	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 ⁴	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 ⁴	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/A	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				74 556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

¹ La localización en estado natural correspondiente a la variante N1303K de un duplicado provocó una ausencia de llamada debida a una cobertura insuficiente.

² 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 librería, ya que los volúmenes de muestra que quedaban en los tubos eran homogéneos y no se tuvo que eliminar ninguna cantidad de volumen.

³ Las pruebas indican que el operador probablemente alternó las muestras 9 y 10 antes de la preparación de la librería.

⁴ La localización en estado natural correspondiente a la variante M1V de un duplicado de cada una de las dos muestras provocó una ausencia de llamada debida a una cobertura insuficiente.

Características de rendimiento somático

Los estudios que se han descrito aquí han utilizado el módulo Somatic Variant (variante somática) para analizar los datos de secuenciación, excepto en el caso de aquellos estudios que empleaban el panel de dos genes, en los que se utilizó un módulo específico del ensayo.

Exactitud

Se llevaron a cabo tres estudios para evaluar la precisión del instrumento MiSeqDx con ADN que se había extraído de las muestras FFPE.

Estudio 1

En este estudio, se ha empleado un ensayo representativo diseñado para interrogar una serie de genes que cubrían 12 588 bases de 23 cromosomas diferentes usando 150 amplicones. El cromosoma Y no se evaluó dado que no contenía regiones de confianza. Las cinco muestras únicas que se utilizaron en este estudio corresponden a una sola familia, dos padres y tres niños, que varios laboratorios habían secuenciado con frecuencia usando diferentes metodologías de secuenciación. Tres muestras pertenecen a mujeres y dos muestras a hombres. Todas las muestras estaban fijadas en formol y embebidas en parafina antes de que se extrajera el ADN para el estudio. La muestra GM12877 se diluyó, en el nivel de ADN, con la muestra GM12878 con el objetivo de crear una GM12877-D para generar un conjunto de variantes con frecuencias cercanas al 5 % y al 10 %. Las pruebas de cada una de las muestras se realizaron por duplicado, excepto en el caso de la GM12877-D, en la que se realizaron pruebas con cinco duplicados. Se determinó la precisión de las SNV, las inserciones y las deleciones comparando los datos del estudio con una base de datos de referencia bien definida. La secuencia de la base de datos de referencia (versión 2016-01 de Platinum Genome) se obtuvo a partir de la combinación de

varias metodologías de secuenciación, datos públicos e información hereditaria. Las regiones genómicas de confianza se definieron teniendo en cuenta este método de referencia, a menos que se indique lo contrario. Las muestras se procesaron ocho veces en total. Las tablas que se exponen para demostrar la precisión se han basado en los datos del primer experimento.

La [Tabla 10](#) engloba 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 10 Coincidencia de los resultados de la llamada de bases del instrumento MiSeqDx con los datos de referencia de seis muestras con características bien definidas

Muestra	Media de índice de llamada	N.º total de variantes	N.º total de variantes TP	N.º total de variantes FN	N.º total de llamadas TN	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	152	147	0	23 719	100	100	100
GM12878	98,4	270	260	0	23 482	100	100	100
GM12879	98,7	192	186	0	23 744	100	100	100
GM12885	99,1	244	236	0	23 713	100	100	100
GM12886	98,7	230	226	0	23 652	100	100	100
GM12877-D ¹		675	650	0		100	100	100
GM12877-D ²	98,4	155	155	0	57 608	100	100	100

¹ Variantes con una frecuencia superior al 20 %.

² Variantes con una frecuencia inferior al 20 %.

Los 150 amplicones se habían diseñado para cubrir un contenido genómico diverso. El contenido de GC de los amplicones oscilaba entre el 26 % y el 87 %. Los amplicones también contenían una serie de repeticiones de nucleótido único (por ejemplo, poli-A y poli-T), dinucleótido y trinucleótido. En el ensayo, se utilizaron seis muestras únicas. Los datos se recopilieron por amplicón [Tabla 11](#) con el objetivo de determinar el efecto del contenido genómico en el % de llamadas correctas. El % de llamadas correctas contiene las llamadas de variantes y de referencia y se sitúa por debajo del 100 %, si se producen llamadas incorrectas o ausencias de llamadas. La ausencia de llamadas se da cuando las llamadas de variantes no superan uno o varios filtros (por ejemplo, cuando la cobertura es insuficiente). No se obtuvieron llamadas incorrectas. La cantidad de ausencias de llamadas variaba de forma significativa en todos los amplicones. El contenido de GC y las diferentes interacciones con él resultaron los predictores más importantes de la ausencia de llamadas. La ausencia de llamadas del 79 %, 2040 de 2580, se debió al incumplimiento de la especificación de cobertura. El mayor

número de ausencia de llamadas se detectó en los amplicones con un contenido de GC superior al 78 %. Se detectó un total de 675 ausencias de llamadas en un amplicón representativo con un contenido de GC del 78 %. Se detectó un total de 1365 ausencias de llamadas en un amplicón representativo con un contenido de GC del 87 %. La cobertura se puede aumentar si se reduce la cantidad de muestras que se cargan en la celda de flujo, lo que permitirá la detección en amplicones con un contenido de GC mayor.

Tabla 11 Datos de precisión por amplicón

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	N.º total de llamadas correctas	N.º total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poli-A (5), poli-C (5), indel	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	1380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poli-G (5)	0,69	1215	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poli-T (10), indel	0,39	1050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poli-A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	1350	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	N/A	0,65	1215	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poli-A (8)	0,35	1117	0	10	99,1
12	2	190323504	190323591	88	88	Poli-T (5)	0,42	1320	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poli-T (5), indel	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	Poli-T (5), poli-A (6), indel	0,3	1365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	N/A	0,43	1395	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poli-T (5), indel	0,42	1095	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	N/A	0,43	1245	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1050	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Poli-A (5), poli-T (5), poli-A (9), TG(3)	0,41	1305	0	30	97,8
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1108	0	2	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poli-A (6)	0,26	1170	0	0	100

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	N.º total de llamadas correctas	N.º total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
23	4	7780541	7780637	97	97	Poli-G (6), poli-T (5), poli-A (5)	0,42	1455	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	N/A	0,29	1169	0	1	99,9
25	4	56236521	56236586	66	62	Poli-A (5), indel	0,36	930	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Poli-A (5)	0,46	1035	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Poli-A (7), indel	0,27	920	0	10	98,9
28	5	1882081	1882158	78	75	N/A	0,78	450	0	675	40,0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	1260	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	N/A	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poli-A (6), indel	0,3	1245	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poli-T (5)	0,37	1005	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	1365	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1125	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Poli-G (6)	0,68	1530	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	1380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	1383	0	27	98,1
38	6	32147987	32148084	98	98	Poli-T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	1455	0	15	99,0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	1425	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Poli-C (6)	0,7	1290	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Poli-G (5), indel	0,61	1410	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poli-A (5)	0,44	1365	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	N/A	0,44	1095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	1320	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Poli-A (7), AG(4)	0,26	1299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	1275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poli-G (5), indel	0,62	1350	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poli-G (6), poli-C (6), indel	0,71	1365	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	N/A	0,31	990	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	1395	0	0	100

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	N.º total de llamadas correctas	N.º total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
51	8	1817312	1817394	83	83	N/A	0,42	1245	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poli-G (7), CTC(4), indel	0,61	1305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1005	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poli-G (6)	0,67	1470	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	N/A	0,49	1440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	Poli-C (6), indel	0,68	1455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poli-G (5), indel	0,47	1170	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	0	0	1365	0
61	10	27317777	27317855	79	79	Poli-T (5)	0,3	1185	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poli-A (5), poli-T (5)	0,2	1350	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	1425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	N/A	0,49	1200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	N/A	0,51	1215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	N/A	0,45	1440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	N/A	0,65	1500	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	930	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	N/A	0,59	1530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Poli-A (5)	0,4	1095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	N/A	0,42	1275	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Poli-G (6)	0,55	1365	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	1275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poli-A (5), CA(3), indel	0,34	1275	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	1275	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Poli-C (5), indel	0,52	1260	0	14	98,9

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	N.º total de llamadas correctas	N.º total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
79	12	26811004	26811096	93	93	Poli-A (7), AC(4)	0,33	1395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	N/A	0,49	1215	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Poli-A (6)	0,35	1065	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Poli-G (5)	0,68	1425	0	0	100
83	12	24167504	24167576	73	73	N/A	0,52	1095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poli-A (5), poli-T (7), poli-A (7), indel	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	1335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1155	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	1005	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	N/A	0,25	1245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poli-T (5), indel	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1215	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	1365	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poli-A (5)	0,41	975	0	60	94,2
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	1410	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Poli-C (5)	0,45	1440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poli-G (5), indel	0,68	1395	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Poli-T (6)	0,43	1425	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	N/A	0,36	1365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1050	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	N/A	0,27	945	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Poli-C (5)	0,67	1425	0	0	100
103	16	3682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	1305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Poli-C (5)	0,67	1560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poli-T (5), indel	0,37	1362	0	3	99,8
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	1335	0	0	100

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	N.º total de llamadas correctas	N.º total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
107	17	3594191	3594277	87	87	Poli-C (5), indel	0,67	1303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	1365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	1395	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poli-T (5)	0,54	1335	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poli-A (13), indel (x2)	0,29	1215	0	78	94,0
112	17	41244394	41244484	91	91	Poli-A (5)	0,34	1365	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Poli-A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	1365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	Poli-T (7)	0,22	1289	0	1	99,9
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	1260	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1005	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	N/A	0,37	1365	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poli-A (6), TG(3)	0,43	1035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poli-A (5), indel	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	1275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	N/A	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	N/A	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	N/A	0,68	1110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	N/A	0,64	1050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	N/A	0,61	1410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1230	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	1050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	1515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1005	0	6	99,4
133	20	62331904	62331994	91	88	Poli-G (6)	0,73	1320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	1305	0	0	100

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	N.º total de llamadas correctas	N.º total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	990	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poli-T (6), CA(3)	0,54	1470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	1305	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poli-A (6), AG(3), indel	0,32	1029	0	7	99,3
139	21	46705575	46705664	90	90	Poli-T (5), poli-A (6)	0,5	1350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	N/A	0,68	1455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	1455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	N/A	0,6	1485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	1380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poli-T (5)	0,26	1035	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Poli-C (5)	0,62	1035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	N/A	0,52	1065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	N/A	0,55	0	0	0	N/A
149	Y	2655519	2655609	91	0	N/A	0,48	0	0	0	N/A
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poli-A (5)	0,37	0	0	0	N/A

Las variantes que presentaron ausencia de llamadas se resumen en la [Tabla 12](#). Se enumeran en la tabla los filtros específicos cuyo resultado fue la ausencia de llamadas.

Tabla 12 Resumen de ausencias de llamadas de variantes

N.º de amplicón	Cromosoma:Posición	Variante	Contenido del amplicón correspondiente	Filtro	Variantes omitidas	Variantes previstas
28	5:1882129	T > G	78 % de GC	LowDP (DP baja) ¹	8	13
52	8:24811064	AG > A	Poli-G (7), CTC(4), 61 % de GC	R3x6 ²	15	15
60	10:11784633	C > T	Poli-GC (3), 87 % de GC	LowDP (DP baja)	13	13
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42 % de GC	R3x6	9	9
111	17:39589692	C > CA	Poli-A (13), 29 % de GC	R3x6	13	13

¹ DP baja: Cobertura baja. Una variante se filtra si la profundidad de al menos uno de los grupos en esa posición determinada está por debajo de 900.

² R3x6: Repetir filtro. Una variante se filtra en caso de que aparezca varias veces, en parte o en su totalidad, en el genoma de referencia adyacente a la posición de la variante. Es necesario que existan al menos seis repeticiones en la referencia y únicamente se tienen en cuenta las repeticiones con una longitud de hasta 3 pb.

Los resultados de la secuenciación de la muestra se compararon con un genotipo muy fiable definido para la NA12878 por el Instituto de estándares y tecnología de EE. UU. (NIST) (v.2.19). De los 150 amplicones, 92 estaban incluidos completamente en las regiones genómicas muy fiables, 41 coincidían parcialmente y 17 no coincidían en absoluto con la secuencia del NIST. El resultado fueron 10 000 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 la [Tabla 13](#).

Tabla 13 Coincidencia de los resultados de las llamadas del instrumento MiSeqDx con la referencia del NIST para la muestra GM12878

Muestra	N.º de amplicones	Media de índice de llamada	N.º total de llamadas de variantes TP	N.º total de llamadas de variantes FN	N.º total de llamadas TN	N.º total de llamadas FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19 231	0	100	100	100

Las cinco muestras que no se habían diluido se analizaron con una mayor profundidad para hacer llamadas de inserciones y deleciones (indels) de menor tamaño [Tabla 14](#). En algunos casos, el indel era común entre dos o más muestras, tal y como se refleja en la columna “N.º total de duplicados de muestras con indel”. Los resultados de ambos duplicados de las cinco muestras se incluyen en la [Tabla 14](#). Se detectó un total de 71 indels cuyo tamaño oscilaba entre 1 y 24 pb en el caso de las inserciones y entre 1 y 25 pb en el caso de las deleciones. Se detectaron 68 inserciones y deleciones cuyo porcentaje de coincidencia positiva era de 1 en cada uno de los casos. Tres inserciones y deleciones no obtuvieron llamadas correctas debido a que cada una de estas variantes presentó ausencia de llamadas a causa del filtro R3x6. Por lo tanto, la PPA no se pudo calcular, ya que excluye las ausencias de llamadas. Las tres variantes eran una deleción de 1 pb (chr8 24811064 AG>A), una deleción de 2 pb (chr10 55892600 TAC>T) y una inserción de 1 pb (chr17 39589692 C>CA).

Tabla 14 Resumen de la detección de indel con MiSeqDx Instrument

Amplicón	Cromosoma	Posición	Tamaño del fragmento analizado	Tipo y longitud del indel del amplicón	Indel	N.º total de duplicados de muestras con indel	N.º de ausencias de llamadas	N.º total de llamadas incorrectas de indel	N.º total de llamadas correctas de indel	PPA
1	1	36450544	93	Deleción de 25 pb	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	Deleción de 3 pb	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	Inserción de 23 pb	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	Deleción de 17 pb	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100

Amplicón	Cromosoma	Posición	Tamaño del fragmento analizado	Tipo y longitud del indel del amplicón	Indel	N.º total de duplicados de muestras con indel	N.º de ausencias de llamadas	N.º total de llamadas incorrectas de indel	N.º total de llamadas correctas de indel	PPA
6	1	236372081	70	Inserción de 5 pb	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	Inserción de 3 pb	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	Inserción de 7 pb	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	Delección de 6 pb	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	Inserción de 5 pb	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	Inserción de 12 pb	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	Inserción de 2 pb	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	Delección de 23 pb	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	Inserción de 9 pb	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	Delección de 1 pb	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	Delección de 8 pb	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	Inserción de 11 pb	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	Delección de 4 pb	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	Inserción de 8 pb	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	Delección de 21 pb	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	Delección de 3 pb	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	Delección de 25 pb	CTTTCACITTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	Delección de 23 pb	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	Inserción de 1 pb	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	Delección de 4 pb	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	Inserción de 1 pb	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	Delección de 4 pb	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	Delección de 11 pb	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	Delección de 1 pb	AG>A	15	15	0	0	N/A
53	8	76518677	67	Inserción de 4 pb	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	Inserción de 4 pb	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	Delección de 21 pb	TCTGGGGGCGAGCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100

Amplión	Cromosoma	Posición	Tamaño del fragmento analizado	Tipo y longitud del indel del amplión	Indel	N.º total de duplicados de muestras con indel	N.º de ausencias de llamadas	N.º total de llamadas incorrectas de indel	N.º total de llamadas correctas de indel	PPA
59	10	5987158	79	Delección de 3 pb	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	Delección de 16 pb	AGCGTCTATAACCAAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	Delección de 2 pb	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	Inserción de 2 pb	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	Inserción de 8 pb	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	Delección de 8 pb	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	Delección de 2 pb	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	Inserción de 21 pb	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	Inserción de 19 pb	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	Inserción de 4 pb	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	Delección de 20 pb	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	Delección de 22 pb	TTTAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	Inserción de 4 pb	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	Delección de 16 pb	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	Delección de 5 pb	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	Delección de 6 pb	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	Delección de 25 pb	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	Inserción de 3 pb	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	Inserción de 4 pb	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	Delección de 7 pb	ATTATTTTC>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	Delección de 1 pb	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	Inserción de 18 pb	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	Inserción de 4 pb	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	84	Inserción de 1 pb	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	Inserción de 24 pb	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	Delección de 4 pb	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	Delección de 12 pb	TTTGTATCTGCTG>T	13	0	0	13	100

Amplión	Cromosoma	Posición	Tamaño del fragmento analizado	Tipo y longitud del indel del amplión	Indel	N.º total de duplicados de muestras con indel	N.º de ausencias de llamadas	N.º total de llamadas incorrectas de indel	N.º total de llamadas correctas de indel	PPA
120	18	38837054	75	Inserción de 22 pb	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	Inserción de 3 pb	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	Delección de 2 pb	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	Delección de 15 pb	TACTTGAGAAGGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	Inserción de 5 pb	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	Inserción de 11 pb	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	Delección de 16 pb	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30300873	66	Inserción de 11 pb	G>GATAAACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	Delección de 21 pb	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	Delección de 5 pb	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	Inserción de 6 pb	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	Inserción de 5 pb	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	Delección de 10 pb	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

Estudio 2

Este estudio ha utilizado muestras de tejido de cáncer colorrectal de FFPE almacenadas en un banco y un ensayo representativo de dos genes que se ha comparado con el método de referencia: la secuenciación bidireccional de Sanger (Sanger). De un total de 1183 sujetos, 441 obtuvieron resultados válidos en el ensayo representativo y en la secuenciación de Sanger. Cuando se evaluaron por sujeto ([Tabla 15](#)), 230 de los 441 sujetos dieron positivo por Sanger (se detectó una mutación por Sanger). De ellos, 227 dieron positivo en el ensayo representativo. Los 211 sujetos restantes de los 441 obtuvieron resultados negativos por Sanger (no se detectaron mutaciones por Sanger). De ellos, 206 dieron negativo en el ensayo representativo. Como resultado, la coincidencia de porcentaje positivo (PPA) fue del 98,7 % y la coincidencia de porcentaje negativo (NPA) del 97,6 % ([Tabla 15](#)).

Tabla 15 Resultados por sujeto de la coincidencia de porcentaje positivo y negativo

Ensayo representativo	Sanger		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	227 ¹	5	232
Negativo	3 ²	206	209
Total	230	211	441

Performance (Rendimiento) Summary (Resumen)		
Coincidencia Estadísticas	Estimación puntual	Exacto IC del 95 %
PPA	227/230 = 98,7 %	[96,2 %, 99,7 %]
NPA	206/211 = 97,6 %	[94,6 %, 99,2 %]

¹Se detectaron 224 coincidencias exactas en el propio sujeto y en todas las mutaciones. En el caso de dos sujetos, MiSeqDx detectó la mutación que se había detectado en Sanger y otra mutación más. En el caso de un sujeto, MiSeqDx y Sanger detectaron mutaciones distintas.

²Un sujeto presentó dos mutaciones detectadas en Sanger. Dos sujetos presentaron una mutación detectada en Sanger.

Estudio 3

Este estudio evaluaba las librerías de ADN que se habían preparado con muestras de FFPE de múltiples tipos de tejido. Un total de 109 muestras FFPE de ocho tejidos diferentes (de colon, de ovario, de páncreas, suprarrenal, de vejiga, de hígado, de tiroides y mamario) y al menos 11 muestras FFPE que representaban cada tipo de tejido. El tejido suprarrenal contenía metástasis de tumores de esófago, pulmón y colon. El otro tejido tenía tumores primarios. El estudio se basó en un ensayo representativo diseñado para interrogar 26 genes que cubrían 21 577 bases en 17 cromosomas diferentes. Se secuenciaron usando Sanger un total de seis genes distintos (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* y *BRAF*) y cada tumor contenía de uno a tres genes secuenciados por Sanger teniendo en cuenta la prevalencia prevista de las mutaciones somáticas en ese tumor. Los resultados de la secuenciación por Sanger identificaban 39 mutaciones somáticas de SNV en 33 de las 109 muestras FFPE. MiSeqDx identificó 36 mutaciones somáticas de SNV en 32 de las 109 muestras FFPE con un falso negativo y dos ausencias de llamadas en posición de variantes. La PPA fue del 97,3 %. MiSeqDx identificó 78.975 bases de referencia en las 109 muestras FFPE con 29 falsos positivos con respecto a la secuenciación por Sanger y 3416 ausencias de llamadas. La NPA fue del 99,9 %. Una delección de dos bases coincidía en ambos métodos. En la [Tabla 16](#) se resumen los resultados por tipo de tejido.

Tabla 16 Coincidencia de porcentaje positivo y negativo por tipo de tejido

Tipo de tejido	N.º de muestras	N.º total de variantes	N.º total de variantes TP	N.º total de variantes FN	N.º total de llamadas TN	N.º total de llamadas FP	N.º total de ausencia de llamadas	PPA	NPA
Suprarrenal	16	6	4	1	11 823	2	607	80	>99,9
Vejiga	12	4	4	0	7070	3	273	100	>99,9
Mama	16	3	3	0	13 439	7	479	100	99,9
Colon	11	6	5	0	8720	2	133	100	>99,9
Hígado	13	3	3	0	7984	1	59	100	>99,9
Ovario	13	7	7	0	10 581	1	724	100	>99,99
Páncreas	17	7	7	0	11 929	12	489	100	99,9
Tiroides	11	3	3	0	7429	1	652	100	>99,9
Total	109	39	36	1	78 975	29	3416	97,3	>99,9

Reproducibilidad

Se llevaron a cabo dos estudios para evaluar la reproducibilidad del instrumento MiSeqDx con ADN que se había extraído de las muestras FFPE. El estudio 1 utilizó múltiples instrumentos. El estudio 2 tenía múltiples centros.

Estudio 1

La reproducibilidad del instrumento MiSeqDx se estableció por medio de dos instrumentos y dos operadores cualificados para un total de ocho experimentos. El ensayo representativo, el contexto genómico del amplicón, las muestras y el método de referencia que se utilizaron fueron los mismos que los que se han descrito más arriba en el Estudio 1 de precisión. Los resultados de cada instrumento se muestran por amplicón [Tabla 17](#) con el objetivo de demostrar la reproducibilidad de las llamadas en todos los instrumentos. Los % de llamadas correctas incluían tanto las llamadas incorrectas como la ausencia de llamadas (no se superaron uno o más filtros en las llamadas de variantes). Los instrumentos generaron cantidades parecidas de ausencias de llamadas dependiendo del amplicón en particular. En el MiSeqDx 1 se observó una sola llamada incorrecta en una región de confianza definida por el estándar de referencia Platinum Genome. La llamada incorrecta era un falso positivo de una llamada de una variante de inserción en el amplicón 64 que interrogaba el cromosoma 10 entre las posiciones 55892599 a 55892687. El amplicón contenía una repetición de dinucleótido de 11.

Tabla 17 Resultados de la reproducibilidad del estudio instrumento a instrumento de MiSeqDx Instrument (por amplicón)

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas
1	1	93	93	Indel	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	Poli-A (5), poli-C (5), indel	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Indel	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Indel	0,49	5518	0	2	5518	0	2
5	1	81	81	Poli-G (5)	0,69	4858	0	2	4860	0	0
6	1	70	70	Poli-T (10), indel	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	Poli-A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Indel	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Indel	0,38	4800	0	0	4800	0	0
10	2	85	81	N/A	0,65	4859	0	1	4859	0	1
11	2	75	75	Poli-A (8)	0,35	4468	0	40	4468	0	40
12	2	88	88	Poli-T (5)	0,42	5280	0	0	5280	0	0
13	2	87	87	Poli-T (5), indel	0,31	5211	0	43	5214	0	40
14	2	91	91	Poli-T (5), poli-A (6), indel	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	N/A	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	Poli-T (5), indel	0,42	4378	0	2	4379	0	1

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas
17	3	93	93	AT(3), indel	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	N/A	0,43	4980	0	0	4980	0	0
19	3	70	70	CT(3), indel	0,49	4193	0	7	4194	0	6
20	3	88	88	Poli-A (5), poli-T (5), poli-A (9), TG(3)	0,41	5220	0	120	5220	0	120
21	3	75	74	Indel	0,57	4432	0	8	4432	0	8
22	4	78	78	Poli-A (6)	0,26	4676	0	4	4676	0	4
23	4	97	97	Poli-G (6), poli-T (5), poli-A (5)	0,42	5820	0	0	5820	0	0
24	4	78	78	N/A	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	Poli-A (5), indel	0,36	3720	0	0	3720	0	0
26	4	71	69	Poli-A (5)	0,46	4140	0	0	4140	0	0
27	4	62	62	Poli-A (7), indel	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	N/A	0,78	3368	0	1132	3485	0	1015
29	5	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	5040	0	0	5040	0	0
30	5	64	64	N/A	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	Poli-A (6), indel	0,3	4979	0	1	4980	0	0

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas
32	5	67	67	Poli-T (5)	0,37	4020	0	0	4020	0	0
33	5	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	5460	0	0	5460	0	0
34	5	75	75	Indel	0,43	4498	0	6	4500	0	1
35	6	102	102	Poli-G (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0
36	6	92	92	Indel	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), indel	0,61	5532	0	108	5532	0	108
38	6	98	98	Poli-T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60
39	6	95	95	Indel	0,53	5697	0	3	5698	0	2
40	6	86	86	Poli-C (6)	0,7	5159	0	1	5160	0	0
41	6	95	94	Poli-G (5), indel	0,61	5638	0	2	5638	0	2
42	6	91	91	Poli-A (5)	0,44	5460	0	0	5460	0	0
43	7	73	73	N/A	0,44	4380	0	0	4380	0	0
44	7	88	88	Indel	0,35	5279	0	1	5276	0	4
45	7	87	87	Poli-A (7), AG(4)	0,26	5184	0	36	5181	0	39
46	7	85	85	Indel	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	Poli-G (5), indel	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	Poli-G (6), poli-C (6), indel	0,71	5460	0	0	5459	0	1

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas
49	7	81	66	N/A	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	Indel	0,35	5580	0	0	5579	0	1
51	8	83	83	N/A	0,42	4980	0	0	4980	0	0
52	8	90	89	Poli-G (7), CTC(4), indel	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Indel	0,3	4020	0	0	4020	0	0
54	9	98	98	Poli-G (6)	0,67	5879	0	1	5880	0	0
55	9	65	65	Indel	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	N/A	0,49	5760	0	0	5760	0	0
57	9	83	83	AT(3)	0,37	4973	0	7	4978	0	2
58	9	97	97	Poli-C (6), indel	0,68	5817	0	3	5818	0	2
59	10	79	78	Poli-G (5), indel	0,47	4679	0	1	4680	0	0
60	10	98	91	GC(3)	0,87	450	0	5010	632	0	4828
61	10	79	79	Poli-T (5)	0,3	4740	0	0	4740	0	0
62	10	90	90	Poli-A (5), poli-T (5)	0,2	5400	0	0	5400	0	0
63	10	95	95	Indel	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	AC(11), indel	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	N/A	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	N/A	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	N/A	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	Indel	0,46	4199	0	2	4200	0	1

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas
69	11	100	100	N/A	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	Indel	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	N/A	0,59	6120	0	0	6118	0	2
72	11	73	73	Poli-A (5)	0,4	4380	0	0	4380	0	0
73	11	85	85	N/A	0,42	5100	0	0	5100	0	0
74	11	91	91	Poli-G (6)	0,55	5437	0	23	5441	0	19
75	11	85	85	Indel	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	Poli-A (5), CA(3), indel	0,34	5100	0	0	5100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5100	0	0	5100	0	0
78	12	84	84	Poli-C (5), indel	0,52	5040	0	60	5038	0	63
79	12	93	93	Poli-A (7), AC(4)	0,33	5577	0	3	5573	0	7
80	12	81	81	N/A	0,49	4860	0	0	4860	0	0
81	12	71	71	Poli-A (6)	0,35	4260	0	0	4260	0	0
82	2	95	95	Poli-G (5)	0,68	5605	0	95	5605	0	95
83	13	73	73	N/A	0,52	4380	0	0	4379	0	1
84	13	89	88	Poli-A (5), poli-T (7), poli-A (7), indel	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Indel	0,49	5340	0	0	5340	0	0
86	13	77	77	Indel	0,39	4620	0	0	4620	0	0

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas
87	14	67	67	GA(3), TA (3)	0,39	4020	0	0	4020	0	0
88	14	83	83	N/A	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	Poli-T (5), indel	0,19	4173	0	147	4173	0	147
90	14	81	81	Indel	0,38	4860	0	2	4860	0	0
91	14	91	91	Indel	0,35	5459	0	1	5460	0	0
92	14	66	66	Poli-A (5)	0,41	3900	0	240	3900	0	240
93	14	94	94	Indel	0,62	5637	0	3	5637	0	3
94	15	98	96	Poli-C (5)	0,45	5760	0	0	5760	0	0
95	15	68	68	Indel	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	Poli-G (5), indel	0,68	5475	0	105	5487	0	93
97	15	95	95	Poli-T (6)	0,43	5699	0	1	5700	0	0
98	15	72	71	Indel	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	N/A	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Indel	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	N/A	0,27	3780	0	0	780	0	0
102	16	95	95	Poli-C (5)	0,67	5700	0	0	5700	0	0
103	16	87	87	TA(3)	0,41	5220	0	0	5220	0	0
104	16	104	104	Poli-C (5)	0,67	6238	0	3	6238	0	3
105	16	91	91	Poli-T (5), indel	0,37	5443	0	17	5444	0	16
106	17	89	89	GC(3)	0,64	5251	0	89	5339	0	1

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas
107	17	87	87	Poli-C (5), indel	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	Indel	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Indel	0,26	5580	0	0	5580	0	0
110	17	91	89	Poli-T (5)	0,54	5340	0	0	5340	0	0
111	17	84	82	Poli-A (13), indel (x2)	0,29	4860	0	308	4860	0	07
112	17	91	91	Poli-A (5)	0,34	5459	0	1	5459	0	1
113	17	92	92	Poli-A (7), AT(3), AT (4), AT (4), indel	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	Indel	0,41	4699	0	41	4700	0	40
115	17	86	86	Poli-T (7)	0,22	5153	0	7	5156	0	4
116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5039	0	1	5039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4020	0	0	4020	0	0
118	18	91	91	N/A	0,37	5460	0	0	5460	0	0
119	18	69	69	Poli-A (6), TG(3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9
120	18	75	75	Poli-A (5), indel	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	CTC(3), indel	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	CT(3), indel	0,45	5098	0	2	5098	0	2
123	18	65	65	N/A	0,48	3900	0	0	3900	0	0

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas
124	19	99	99	N/A	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	N/A	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	N/A	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	N/A	0,61	5640	0	1	5638	0	3
128	20	82	82	AC(3)	0,59	4920	0	0	4920	0	0
129	20	76	76	CT(3)	0,58	4559	0	1	4558	0	2
130	20	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	4200	0	0	4200	0	0
131	20	101	101	Indel	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	Indel	0,36	4020	0	31	4020	0	25
133	20	91	88	Poli-G (6)	0,73	5277	0	3	5274	0	6
134	20	87	87	Indel	0,57	5218	0	2	5218	0	2
135	21	66	66	Indel	0,35	3959	0	1	3957	0	3
136	21	98	98	Poli-T (6), CA(3)	0,54	5880	0	0	5880	0	0
137	21	87	87	GT(3), indel	0,39	5220	0	0	5220	0	0
138	21	69	69	Poli-A (6), AG(3), indel	0,32	4119	0	31	4113	0	37
139	21	90	90	Poli-T (5), poli-A (6)	0,5	5399	0	1	5399	0	1
140	22	100	100	Indel	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	N/A	0,68	5819	0	1	5819	0	1
142	22	97	97	Indel	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	N/A	0,6	5940	0	0	5940	0	0

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas	Total de llamadas correctas	Total de llamadas incorrectas	N.º total de ausencia de llamadas
144	22	92	92	Indel	0,66	5519	0	1	5519	0	1
145	X	69	69	Poli-T (5)	0,26	4139	0	1	4140	0	0
146	X	69	69	Poli-C (5)	0,62	4136	0	4	4137	0	3
147	X	71	71	N/A	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	Y	65	0	N/A	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	N/A	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	Poli-A (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Los resultados del estudio de reproducibilidad se analizaron por operador mediante la frecuencia de variante [Tabla 18](#). El análisis demostró que las frecuencias de variantes eran coherentes en el caso de todos los operadores. Se expone el promedio de frecuencias de variantes con una desviación estándar de +/- 1.

Tabla 18 Resultados operador a operador de MiSeqDx Instrument

Rango de frecuencia de variantes	N.º de variantes únicas	N.º total de variantes analizadas por el Operador 1	N.º total de variantes analizadas por el Operador 2	Promedio (desviación estándar) de la frecuencia de variante comunicada por el Operador 1	Promedio (desviación estándar) de la frecuencia de variante comunicada por el Operador 2
Frecuencia alta (~100 %)	1112	1072	1072	0,96 +/- 0,05	0,96 +/- 0,05
Frecuencia media (~50 %)	3240	3151	3161	0,49 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

Rango de frecuencia de variantes	N.º de variantes únicas	N.º total de variantes analizadas por el Operador 1	N.º total de variantes analizadas por el Operador 2	Promedio (desviación estándar) de la frecuencia de variante comunicada por el Operador 1	Promedio (desviación estándar) de la frecuencia de variante comunicada por el Operador 2
Frecuencia baja (entre el 3 % y el 7 %)	620	618	612	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01

Los resultados del estudio de reproducibilidad de cada muestra se presentan como suma de los ocho experimentos [Tabla 19](#). La detección de cada tipo de variante se evalúa de forma independiente: SNV, inserciones y deleciones por separado. Se excluyen las posiciones de referencia. Este análisis demostró que los resultados de las variantes eran reproducibles en todas las muestras.

Tabla 19 Coincidencia de los resultados de las llamadas de bases de MiSeqDx Instrument por muestra

Muestra	SNV				Inserciones				Deleciones			
	N.º total	N.º total de TP	N.º total de FP	N.º total de FN	N.º total	N.º total de TP	N.º total de FP	N.º total de FN	N.º total	N.º total de TP	N.º total de FP	N.º total de FN
GM12877	592	574	2	0	336	336	0	0	228	272	0	0
GM12878	1456	1432	0	0	320	304	0	0	384	352	0	0
GM12879	912	896	0	0	336	320	0	0	288	272	0	0
GM12885	1200	1192	0	0	400	384	0	0	352	320	0	0
GM12886	1104	1104	0	0	368	352	0	0	368	352	0	0
GM12877-D1 ¹	3640	3582	0	0	800	760	0	0	960	880	0	0
GM12877-D2 ²	400	398	0	0	520	516	0	0	560	556	0	0

¹Variantes con una frecuencia superior al 20 %.

²Variantes con una frecuencia inferior al 20 %.

Los datos obtenidos en los 8 experimentos que se llevaron a cabo en este estudio de reproducibilidad corroboran la afirmación de que el instrumento MiSeqDx puede secuenciar de forma coherente:

- Contenido de GC ≥ 19 % (se llamaron correctamente todas las bases de 120 amplicones de los 120 secuenciados con el 19 % de contenido de GC y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 3,4 %)
- Contenido de GC ≤ 73 % (se llamaron correctamente todas las bases de 120 amplicones de los 120 secuenciados con el 73 % de contenido de GC y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,1 %)
- Longitudes de poli-A ≤ 8 (se llamó correctamente la repetición de poli-A de ocho nucleótidos en 120 de los 120 amplicones secuenciados que contenían poli-A = 8)
- Longitudes de poli-T ≤ 10 (se llamó correctamente la repetición de poli-T de 10 nucleótidos en 120 de los 120 amplicones secuenciados que contenían poli-T = 10)
- Longitudes de poli-G ≤ 6 (se llamó correctamente la repetición de poli-G de seis nucleótidos en 720 de los 720 amplicones secuenciados que contenían poli-G = 6)
- Longitudes de poli-C ≤ 6 (se llamó correctamente la repetición de poli-C de seis nucleótidos en 359 de los 360 amplicones secuenciados que contenían poli-C = 6 y hubo una ausencia de llamadas)
- Longitudes de repetición dinucleótida $\leq 4 \times$ (se llamaron correctamente todas las bases de 600 de los 600 amplicones secuenciados con repetición dinucleótida de $4 \times$ y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,4 %)
- Longitudes de repetición de trinucleótido $\leq 5 \times$ (se llamaron correctamente todas las bases de 120 de los 120 amplicones secuenciados con repetición de trinucleótido de $5 \times$ y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 1,9 %)
- Inserciones de 24 bases o menos y deleciones de 25 bases o menos
 - Se llamaron correctamente inserciones de 24 bases en 120 muestras de las 120 en total
 - Se llamaron correctamente deleciones de 25 bases en 182 muestras de las 184 y se detectó la ausencia de llamadas en dos muestras

Estudio 2

Se llevó a cabo un estudio externo para evaluar la reproducibilidad del ensayo representativo de dos genes, que se describía en el estudio de precisión 2, en tres centros de pruebas externos (con dos operadores por centro), un lote de reactivos y tres días no

consecutivos en los que se efectuaron las pruebas. Las pruebas se llevaron a cabo con seis paneles de muestras con características bien definidas de muestras de ADN genómico a partir de muestras clínicas de FFPE o de estirpes celulares. Cada panel contenía 10 miembros, lo que hacía un total de 60 miembros entre todos los paneles.

Los 60 miembros del panel contenían duplicados de cuatro muestras únicas en estado natural (para las mutaciones de panel), 12 muestras con mutación única (con una sola mutación), que se prepararon con niveles de frecuencia de mutación tanto altos como bajos, y dos muestras con mutación única (con una sola mutación), que se prepararon solo con nivel de frecuencia de mutación bajo. Cada muestra con un nivel de frecuencia de mutación/muestra único (las pruebas se realizaron por duplicado en cada uno de los experimentos) tuvo 36 posibles resultados (2 duplicados × 2 operadores × 3 días × 3 centros), siempre que cada uno de los resultados obtenidos fuera válido.

El porcentaje previsto de llamadas (PEC, Percent Expected Call) de todas las variantes positivas y negativas se evaluó comparando el resultado del ensayo representativo con el resultado previsto de las mutaciones (mutaciones previstas, se hayan detectado o no) en cada muestra. El PEC se calcula multiplicando 100 % por el número de llamadas previstas dividido entre el número de intentos de llamada. El intervalo de confianza bilateral del 95 % se calcula por medio del método de puntuación Wilson.

Al combinar los centros, los índices de muestra de paso fueron superiores o iguales al 94,7 % durante el primer experimento en el que se utilizó la muestra o en muestras que se habían probado en experimentos que dieron un resultado válido de primer paso. El PEC en el nivel de mutación de todas las muestras que contenían mutaciones fue del 99,6 % (905 de 909) (IC del 95 %; 98,9 y 99,8). La cantidad de intentos de llamadas en el total de las 56 mutaciones de panel (sin tener en cuenta si la mutación que se detectaba estaba prevista o no) para todas las muestras válidas fue de 58 856 (56 × 1051). De estas 58 856 observaciones del nivel de mutación, tan solo se observaron seis incidencias en las que los resultados observados y previstos no coincidían. El PEC en el nivel de mutación en todas las variantes positivas y negativas de todos los miembros del panel, tanto con mutaciones como en estado natural, combinadas fue del 99,99 % (58 850 de 58 856).

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

Este estudio verificaba el corte del ensayo y establecía el Límite de detección (LoD) de MiSeqDx con un panel representativo. En resumen, las estirpes celulares de Platinum Genome con características bien definidas GM12878 y GM12877 se fijaron en formol y se embebieron en parafina para, a continuación, extraer el ADN. GM12878 se diluyó con GM12877 de forma que las frecuencias de variantes de 70 variantes (52 SNV, nueve inserciones y nueve deleciones) se acercaran a 0,05. Dos operadores analizaron las dos muestras de ADN usando dos instrumentos con dos lotes de reactivos en un total de 10 experimentos de secuenciación con MiSeqDx. Los resultados obtenidos fueron de 40 duplicados por cada variante en la muestra GM12878 y 60 duplicados por cada coordenada en

estado natural correspondiente en la muestra GM12877 por cada lote de reactivos. El LoB y el LoD se calcularon usando el enfoque clásico que establece el protocolo CLSI EP17-A2 con la opción no paramétrica. Se calcularon tanto el LoB como el LoD de SNV, inserciones y deleciones de forma independiente por medio de la agrupación de frecuencias de variantes por cada tipo de variante determinado. El error del Tipo I se definió como 0,01 y el error del Tipo II como 0,05.

En el caso del LoB, las frecuencias de variantes agrupadas se clasificaron de la más baja a la más alta y se calculó la posición nonagesimonovena de la clasificación para cada lote de reactivos por cada tipo de variante (Tabla 20). El software MiSeqDx emplea un corte (LoB eficiente) de frecuencia de variante de 0,026 para establecer la detección cualitativa de variantes. El límite del blanco que se había calculado confirmó que este corte daba como resultado un error de Tipo I de, como máximo, 0,01.

Tabla 20 Límite del blanco

Tipo de variante	N.º total de frecuencias de variantes	LoB del Lote de reactivos 1 (%)	LoB del lote de reactivos 2 (%)
SNV	3120	0,87	0,75
Inserción	540	0,79	0,60
Delección	540	0,96	0,84

En el caso del LoD, se calculó el porcentaje de frecuencia de mutación individual de cada lote de reactivos por cada tipo de variante que no superaba el valor de corte de 0,026 (Tabla 21). Debido a que los porcentajes eran inferiores al 5 % (0,05) correspondiente al error de tipo II, se calculó la mediana de las frecuencias de variantes combinadas para obtener el LoD (Tabla 21). El LoD de cada tipo de variante se tomó del valor más alto de los dos que se habían calculado para los dos lotes de reactivos: 5,45 % en las SNV, 4,88 % en las inserciones y 5,44 % en las deleciones.

Tabla 21 Límite de detección

Lote de reactivos	Tipo de variante	N.º total de frecuencias de variantes	N.º de mediciones de las VF <2,6 %	% de mediciones de las VF <2,6 %	Límite de detección (%)
1	SNV	2080	4	0,20	5,45
	Inserción	360	0	0,00	4,86
	Delección	360	2	0,60	5,44

Lote de reactivos	Tipo de variante	N.º total de frecuencias de variantes	N.º de mediciones de las VF <2,6 %	% de mediciones de las VF <2,6 %	Límite de detección (%)
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Inserción	360	0	0,00	4,88
	Delección	360	0	0,00	5,24

Los estudios que se exponen a continuación demuestran las características de rendimiento de MiSeqDx con otro ensayo representativo que estudia 56 mutaciones en dos genes cancerígenos de interés clínico (panel de mutaciones). El panel de mutaciones se ha diseñado expresamente con el objetivo de detectar 56 mutaciones en dos genes cancerígenos de interés clínico (Gen 1 y Gen 2). El ensayo establece, de forma simultánea, la presencia o ausencia de cada una de las 56 mutaciones en cada muestra que se secuencia. El método de referencia que se empleó en estos estudios fue la secuenciación bidireccional de Sanger.

Precisión lote a lote

El estudio de precisión lote a lote se llevó a cabo con el fin de evaluar el rendimiento del instrumento MiSeqDx en los lotes de los kits de reactivos que se fabrican (incluía la calificación de muestras, la preparación de librerías y los reactivos de secuenciación) por medio del ensayo representativo de dos genes con un panel de cinco muestras de mezcla de FFPE que cumplen los requisitos para la calificación de muestras. Cada muestra de FFPE contenía dos mutaciones únicas: una con un nivel de frecuencia de mutación más bajo (del 8 % aproximadamente) y otra con un nivel de frecuencia de mutación alto (del 14 % aproximadamente). Se recogieron 12 observaciones de cada una de las cinco mezclas de muestras durante un período de tres días no consecutivos y con tres lotes de los kits de reactivos. La cantidad total de observaciones del estudio en todos los lotes de reactivos fue de 180 en todas las mezclas de muestras y de 360 en todos los niveles de frecuencia de mutación. Teniendo en cuenta todos los lotes y todos los días, el 99,7 % de las observaciones (359 de 360) mostraron los resultados que estaban previstos con respecto a las mutaciones. Una mutación con una frecuencia baja se llamó de forma incorrecta como de estado natural. Se llevó a cabo un análisis del componente de varianza en cada una de las mutaciones/los niveles de frecuencia de mutación con el objetivo de estimar la variabilidad del sistema. La desviación estándar total oscilaba entre 0,011 y 0,029. La desviación estándar total del componente del lote de reactivos oscilaba entre 0 y 0,015.

Historial de revisiones

N.º de documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de documento 200006218 v02	Octubre de 2023	Se actualizaron las referencias a Local Run Manager para la versión 4. Se ha actualizado el etiquetado para añadir los datos del promotor australiano. Se han corregido discrepancias en las que las instrucciones de uso difieren del informe del estudio de verificación del instrumento para MiSeqDx.
N.º de documento 200006218 v01	Mayo de 2022	Se ha añadido CN de las instrucciones de uso de MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro al apartado Materiales y equipo necesarios, no suministrados. Se ha añadido información de pruebas de MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro al apartado Características de rendimiento. Se ha eliminado la nota de precaución específica para EE. UU. de las Advertencias y Precauciones.
N.º de documento 200006218 v00	Noviembre de 2021	Versión inicial que admite MOS v4.0 y Local Run Manager v3.0.

Patentes y marcas comerciales

Este documento y su contenido son propiedad exclusiva de Illumina, Inc. y sus empresas vinculadas ("Illumina") y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes en relación 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 de 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, autor ni consuetudinarios o derechos similares de terceros.

Para garantizar el uso correcto y seguro de los productos descritos en este documento, el personal cualificado y adecuadamente capacitado debe seguir las instrucciones incluidas en él de manera rigurosa y expresa. Se debe leer y entender por completo 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 (TANTO EN LOS USUARIOS COMO EN 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 (LO QUE INCLUYE LAS PIEZAS O EL SOFTWARE).

© 2023 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

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

Información de contacto



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



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

Promotor australiano

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

Etiquetado de productos

Para obtener 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.