

## Instrucciones de uso

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.

## Uso previsto

TruSight™ Whole Genome es un dispositivo de diagnóstico cualitativo *in vitro* diseñado para la secuenciación del genoma completo y la detección de variantes de nucleótido único, inserciones/deleciones, variantes de número de copias, experimentos de homocigosis, expansiones de repeticiones cortas en tándem y variaciones mitocondriales en el ADN genómico humano extraído de la sangre.

TruSight Whole Genome incluye TruSight Whole Genome Dx Library Prep con índices UD y el software TruSight Whole Genome Analysis Application. El dispositivo está diseñado para utilizarse con aplicaciones de línea germinal posteriores compatibles para desarrollar ensayos de diagnóstico *in vitro*, y por personal de laboratorio cualificado y desarrolladores de ensayos.

TruSight Whole Genome está indicado para utilizarse en NovaSeq™ 6000Dx Instrument.

## Resumen y explicación

TruSight Whole Genome es un ensayo de secuenciación de nueva generación que utiliza la preparación de genotecas sin PCR basada en tagmentación, a partir del ADN genómico (ADNg) extraído de sangre humana completa periférica, y la secuenciación y el análisis principal en Illumina® NovaSeq 6000Dx Instrument.

El análisis secundario se realiza con el software TruSight Whole Genome Analysis Application en el incluido y requerido Illumina DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx e incluye demultiplexado, alineación con el genoma de referencia humano GrCh38/hg38 y llamada de variantes, así como anotación y aplicación de las especificaciones de los parámetros de medición de control de calidad (CC) en la [Tabla 1](#) para garantizar el rendimiento analítico. Los resultados del ensayo incluyen informes de CC del experimento y la muestra, y archivos de formato de llamada de variantes de genoma (VCF) para su uso con software compatible de análisis terciario posterior y de generación de informes.

TruSight Whole Genome evalúa globalmente las variantes genómicas en las regiones codificantes y no codificantes del genoma humano. La evaluación de variantes incluye la detección de variantes pequeñas, variantes en el número de copias (CNV), experimentos de homocigosis (ROH) y expansiones de repeticiones cortas en tándem (STR). Además, TruSight Whole Genome detecta la ausencia del alelo c.840C de SMN1 (NM\_000344.3:c.840C>T), que podría indicar la deleción del gen SMN1 o la conversión del gen SMN1/SMN2.<sup>1,2</sup> La pérdida bialélica del alelo c.840C de SMN1 es responsable de aproximadamente el 95 % de los casos de atrofia muscular espinal (AME).<sup>3</sup>

[Tabla 2](#) proporciona información sobre los tipos de variantes validados con TruSight Whole Genome.

Tabla 1 TruSight Whole Genome Especificaciones de los parámetros de medición de calidad

Tipo de resultado	Criterio de medición	Especificación
CC del experimento de secuenciación	% total $\geq$ Q30	$\geq$ 85,0
CC de FASTQ	Rendimiento por muestra (bps)	$\geq$ 90 000 000 000
CC de genoteca de muestras	Cobertura autosómica media	$\geq$ 35,0
	Porcentaje de autosomas con una cobertura mayor de 20X	$\geq$ 93,94
	Cobertura normalizada entre el 60 % y el 79 % de los grupos de GC	$0,82 \leq x \leq 1,13$
	Cobertura normalizada entre el 20 % y el 39 % de los grupos de GC	$0,97 \leq x \leq 1,06$
	Cobertura mitocondrial media	$\geq$ 500,0
	Porcentaje de bases Q30	$\geq$ 85,0
	Contaminación estimada de la muestra	$\leq$ 0,005

Tabla 2 Variantes detectadas validadas con TruSight Whole Genome

Tipo de variante	Detección validada de variantes
Variantes pequeñas	Variantes de nucleótido único (SNV), inserciones/deleciones cortas (1-31 pb)
Variantes en el número de copias (CNV)	$\geq$ 10 kb de ganancias y pérdidas
Experimentos de homocigosis (ROH)	$\geq$ 500 kb
SNV mitocondriales	% heteroplasmia si $\geq$ 4,75 %
Expansiones de repeticiones cortas en tándem (STR)	Locus específicos (AFF2, AR, ATN1, ATXN1, ATXN10, ATXN2, ATXN3, ATXN7, ATXN8OS, C9ORF72, CACNA1A, CBL, CNBP, CSTB, DIP2B, DMPK, FMR1, FXN, GLS, HTT, JPH3, NIPA1, NOP56, NOTCH2NL, PABPN1, PHOX2B, PPP2R2B y TBP)
Variante de SMN1	NM_000344.3:c.840C/T

## Principios del procedimiento

TruSight Whole Genome está indicado para la preparación de genotecas sin PCR para producir datos de secuenciación del genoma completo humano. El ensayo comienza con la preparación de genotecas a partir de

ADN genómico cuantificado extraído de sangre completa humana periférica, incluye secuenciación y análisis en NovaSeq 6000Dx Instrument utilizando el TruSight Whole Genome Analysis Application, y finaliza con la determinación y anotación de variantes.

El procedimiento del ensayo de TruSight Whole Genome consta de los siguientes pasos:

- **Planificación de lotes y creación de experimentos:** se recomienda encarecidamente planificar el lote y los experimentos antes de iniciar la preparación de la genoteca. Se pueden preparar hasta 24 genotecas de muestras en un lote de preparación de genotecas. En función del número de muestras, se pueden utilizar diferentes configuraciones de celda de flujo (6 unidades de plexado en S2 y 16 unidades de plexado en S4). El ID del tubo de genotecas, los nombres de las muestras y la indexación correspondiente se registran durante la planificación y la creación del experimento. Consulte Guía de TruSight Whole Genome Analysis Application (n.º de documento 200049931) para obtener más información sobre la creación de experimentos. Siga el lote planificado durante la ejecución del flujo de trabajo de preparación de genotecas.
- **Preparación para el protocolo:** algunos reactivos están congelados y deben ponerse a temperatura ambiente. Debido al flujo de trabajo corto, es posible completar la preparación y comenzar la secuenciación el mismo día. Por lo tanto, los consumibles de secuenciación para los experimentos planificados también pueden descongelarse durante este paso. Las muestras de ADN genómico cuantificado se descongelan y diluyen para optimizar la entrada de ADN.
- **Preparación de genotecas**
  - **Tagmentación de ADN genómico:** utiliza Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF) para tagmentar la entrada de ADN. Durante la tagmentación, el ADN<sub>g</sub> se fragmenta, se tagmenta con adaptadores y se inmoviliza en la superficie de las bolas magnéticas de BLT-PF.
  - **Limpieza posterior a la tagmentación:** limpia el ADN tagmentado con adaptador en las BLT-PF y elimina el tampón de parada para prepararse para la ligación de índices.
  - **Ligación de índices:** agrega índices dobles únicos a las genotecas para permitir la multiplexación. Realiza la extensión del espacio y eluye las genotecas de ADN de una cadena de las bolas.
  - **Selección de tamaño y limpieza de las genotecas:** un procedimiento de purificación de bolas con selección de tamaño bilateral elimina fragmentos demasiado pequeños y demasiado grandes para alcanzar una longitud media de fragmento de aproximadamente 450 pb, con un intervalo de aproximadamente 360 a 550 pb.
  - **Agrupar y desnaturalizar genotecas:** la función de autonormalización de BLT-PF permite la agrupación por volumen sin qPCR u otra normalización. El volumen especificado de cada genoteca se agrupa de acuerdo con el plan para cada experimento y se desnaturaliza con 0.2N NaOH (HP3 diluido). A continuación, la agrupación desnaturalizada se transfiere al tubo de genotecas de NovaSeq 6000Dx con el ID correspondiente al experimento planificado.
- **Secuenciación y análisis:** los consumibles en la configuración S2 y/o S4 se cargan en el NovaSeq 6000Dx Instrument, incluidos los tubos de genotecas de NovaSeq 6000Dx asociados con genotecas agrupadas. Tras la carga, se escanea el ID del tubo de genotecas y, si se introduce durante la planificación del experimento, se utiliza para seleccionar el experimento planificado correspondiente. De lo contrario, el experimento planificado asociado debe seleccionarse manualmente.

Secuenciación y análisis primario: las genotecas agrupadas se colocan en una celda de flujo y, a continuación, se secuencian mediante la química de secuenciación por síntesis (SBS) del NovaSeq 6000Dx. El proceso químico de SBS usa un método basado en terminadores reversibles para detectar bases de nucleótidos únicos marcados con un colorante fluorescente a medida que se incorporan a las cadenas de ADN en crecimiento.

El software Real-Time Analysis (RTA) realiza un análisis principal que incluye una llamada de base y la asignación de una puntuación de calidad a cada llamada de base. Los datos del análisis principal se transfieren automáticamente a Illumina DRAGEN Server.

La demultiplexación y el análisis de DRAGEN se realizan automáticamente con TruSight Whole Genome Analysis Application. Como parte de este análisis, cada experimento y genoteca de muestras se revisan para comprobar su validez utilizando los parámetros analíticos descritos en [Controles de calidad, en la página 35](#), y los resultados se proporcionan en informes de muestras individuales y consolidados. Para las genotecas de muestras válidas, se generan archivos de formato de llamada de variante (VCF) del genoma anotado. Para obtener más información sobre el flujo de trabajo del análisis, consulte Guía de TruSight Whole Genome Analysis Application (n.º de documento 200049931).

## Limitaciones del procedimiento

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- TruSight Whole Genome es compatible con ADN genómico derivado de sangre completa periférica humana.
- El ensayo no incluye reactivos para la extracción o cuantificación de ADN. Los resultados de las pruebas analíticas, incluidas las [Sustancias interferentes, en la página 40](#), se han obtenido con sangre completa utilizando kits de extracción de ADN representativos y kits de cuantificación de ADN. Todas las pruebas de diagnóstico desarrolladas para su uso con TruSight Whole Genome requieren una validación completa de todos los aspectos del rendimiento con el kit de extracción y cuantificación de ADN elegido.
- El ensayo se ha configurado y probado para los conjuntos de índice y plexicidad de la muestra indicados en la tabla siguiente.

Tamaño del lote de preparación de genotecas	Plexicidad	Configuración del experimento	Indexación
6, 12, 18 o 24 muestras	6 unidades de plexado	1-4 experimentos S2	Juego S2 1 a 4
16 muestras	16 unidades de plexado	1 experimento S4	Juego S4 1 o 2
22 muestras	16 unidades de plexado + 6 unidades de plexado	1 experimento S4 + 1 experimento S2	Juego S4 1 o 2, juego S2 1 a 4 (no se utiliza para S4)

- El ensayo no exige el seguimiento positivo de las muestras. Aunque el resultado resumido del CC de la ploidía notificado por el software puede utilizarse opcionalmente para identificar intercambios de muestras, no identificará a los hombres intercambiados por hombres ni a las mujeres intercambiadas por mujeres.
- El ensayo solo proporciona validación hasta la salida de los archivos VCF del genoma. Todas las pruebas de diagnóstico desarrolladas para su uso con TruSight Whole Genome requieren una validación completa de todos los aspectos de su rendimiento con las aplicaciones posteriores elegidas.
- El ensayo no informa de las llamadas de variantes de las muestras que no superan el control de calidad.
- El ensayo define niveles de confianza altos solo para SNV e inserciones/deleciones de 1-5 pb debido a los estrictos criterios utilizados para definir un contexto genómico como de confianza alta para un tipo de variante dado en la [Determinación del nivel de confianza de las variantes pequeñas, en la página 41](#).
- El ensayo está diseñado para evaluar las CNV en todo el genoma notificable, independientemente del contexto genómico, y excluye regiones con características que reflejan limitaciones del genoma de referencia, como centrómeros, telómeros y CNV comunes segregadas en poblaciones.
- El rendimiento del ensayo no se evaluó para variantes de número de copias inferiores a 10 kb.
- El ensayo no notifica translocaciones, inversiones ni reordenaciones equilibradas.
- El rendimiento del ensayo no se evaluó para las inserciones o deleciones de ADN mitocondrial (ADNmt).
- El ensayo solo notifica los resultados de los locus de STR enumerados en la [Tabla 2](#). Cuando las longitudes de STR expandidas reales superan aproximadamente los 135 pb, la longitud observada a menudo será una subestimación de la longitud real debido a limitaciones técnicas de lecturas cortas, siendo este efecto aún más pronunciado en FMR1. Una vez que la longitud real de STR supera la longitud mediana del fragmento (aproximadamente 330 pb), la longitud de STR se estabiliza.
- El ensayo no notifica el número de copias de SMN1 o SMN2.
- El ensayo no hace afirmaciones sobre la patogenicidad de las variantes detectadas.

## Componentes del producto

TruSight Whole Genome consta de lo siguiente:

- TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes, 24 sample (n.º de catálogo 20093209)  
y
- TruSight Whole Genome Analysis Application (n.º de catálogo 20106190, instalado por personal capacitado de Illumina)

## Reactivos

### Reactivos suministrados

#### TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 1, n.º de referencia 20072256

Nombre de reactivo	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Temperatura de almacenamiento
Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF)	1	460 µl	Las Streptavidin Magnetic Beads se unen a los transposomas en una solución acuosa tamponada.	Entre -25 °C y -15 °C
Extension-Ligation Mix (ELM)	1	1,6 ml	Ligasa, DNA Polymerase y dNTP en solución acuosa tamponada.	Entre -25 °C y -15 °C
2N NaOH (HP3)	1	400 µl	Solución de hidróxido sódico 2 N (NaOH).	Entre -25 °C y -15 °C
Tagmentation buffer 1 (TB1)	1	290 µl	Solución acuosa tamponada que contiene sal de magnesio y dimetilformamida.	Entre -25 °C y -15 °C

#### TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 2, n.º de referencia 20072257

Nombre de reactivo	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Temperatura de almacenamiento
Tagmentation Wash Buffer 2 (TWB2)	1	41 ml	Solución acuosa tamponada que contiene detergente y sal.	Entre 15 °C y 30 °C
Resuspension Buffer (RSB)	1	20 ml	Solución acuosa tamponada.	Entre 15 °C y 30 °C
Cleanup Beads (CB)	1	10 ml	Bolas paramagnéticas de fase sólida en solución acuosa tamponada.	Entre 15 °C y 30 °C

Nombre de reactivo	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Temperatura de almacenamiento
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	1,4 ml	Solución de detergente en agua.	Entre 15 °C y 30 °C
Neutralization Buffer (NB)	1	450 µl	Solución Tris-HCl.	Entre 15 °C y 30 °C

### TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes, n.º de referencia 20072258

Nombre de reactivo	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Temperatura de almacenamiento
UDI PCR-Free (32 Indexes)	1	37 µl	Adaptadores de índices dobles (UD) exclusivos dispuestos en placa.	Entre -25 °C y -15 °C

## Consumibles necesarios, no suministrados

- Etanol al 100 % (etanol puro), de biología molecular
- Agua libre de RNasa/DNasa certificada
- NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (n.º de catálogo 20046931)
- NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 ciclos) (n.º de catálogo 20046933)
- NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (n.º de catálogo 20062292)
- NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (n.º de catálogo 20062293)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube (n.º de catálogo 20062290)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube, envase de 24 (n.º de catálogo 20062291)

## Conservación y manipulación

- La temperatura ambiente se define como la temperatura que varía entre 15 °C y 30 °C.
- Si alguno de los envases o contenidos de TruSight Whole Genome Dx Library Prep está dañado o comprometido, póngase en contacto con el servicio de atención al cliente de Illumina.
- Los reactivos son estables si se conservan siguiendo las indicaciones hasta la fecha de caducidad especificada en las etiquetas de los kits. Para conocer las condiciones de almacenamiento, consulte

*Reactivos suministrados, en la página 6.* Conserve los componentes del ensayo a la temperatura especificada y no utilice reactivos caducados. No intercambie los componentes de lotes de kit distintos. Los lotes de kit se identifican con las etiquetas del ensayo.

- Los cambios en el aspecto físico de los reactivos proporcionados pueden señalar el deterioro de los materiales. Si se producen cambios en el aspecto físico (por ejemplo, cambios evidentes en el color del reactivo o un aspecto turbio), no use los reactivos. Si se observan precipitados en el ST2, caliente a una temperatura de 37 °C durante 10 minutos y, a continuación, agite en vórtex hasta que se disuelvan los precipitados.
- Se ha evaluado la estabilidad de TruSight Whole Genome Dx Library Prep y se ha demostrado el rendimiento de los tubos congelados para un máximo de cuatro usos cuando se congelan entre usos.

## Materiales y equipo

### Equipo necesario, no suministrado

Compruebe el estado de calibración del equipo antes de iniciar el ensayo.

Equipo	Proveedor
Vórtex con capacidad para 3000 rpm, fondo plano o copa	Proveedor de laboratorio general
Incubadora de micromuestras calibrada para garantizar una precisión de temperatura de $\pm 2$ °C	SciGene, n.º de catálogo 1057-30-O (o equivalente)
Fragmento de termobloque de micromuestras para placas MIDI de 96 pocillos	Illumina, n.º de catálogo BD-60-601
Microcentrifugado	Proveedor de laboratorio general
Centrífuga de microplacas de 96 pocillos	Proveedor de laboratorio general
Agitador de placas con las siguientes especificaciones: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede agitar a 1800 rpm</li> <li>• Constante de órbita de mezcla 2 mm</li> <li>• Precisión de mezcla de <math>\pm 25</math> rpm</li> </ul>	VWR, n.º de catálogo 1808-0506 (o equivalente)
Rodillo o cuña de sellado	Proveedor de laboratorio general



Equipo	Proveedor
Soporte magnético con las especificaciones siguientes: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diseñado para una precipitación/separación de bolas paramagnéticas</li> <li>• Imanes en el lateral del soporte, no en la parte inferior</li> <li>• Para placas MIDI de 96 pocillos</li> </ul>	Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo AM10027 (o equivalente)
NovaSeq 6000Dx Instrument	illumina, n.º de catálogo 20068232
Pipetas de precisión (canal único): <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 µl</li> <li>• 20 µl</li> <li>• 200 µl</li> <li>• 1000 µl</li> </ul> Pipetas de precisión (8 canales): <ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 µl</li> <li>• 200 µl</li> </ul> Asegúrese de que las pipetas se calibran con regularidad y tienen una precisión del 5 % con respecto al volumen indicado	Proveedor de laboratorio general
Ayuda para pipeta	Proveedor de laboratorio general

## Materiales necesarios, no suministrados

Asegúrese de que dispone de los materiales necesarios antes de empezar el protocolo.

El protocolo se ha optimizado y validado usando los elementos enumerados. No se garantiza un rendimiento comparable cuando se usan materiales alternativos.

Materiales	Proveedor
Pipetas serológicas de 5 ml	Proveedor de laboratorio general
Pipetas serológicas de 10 ml	Proveedor de laboratorio general

Materiales	Proveedor
Sellos adhesivos para placas de 96 pocillos con las siguientes especificaciones: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Poliéster desprendible, transparente en términos ópticos</li> <li>• Adhesivo resistente que aguanta varios cambios de temperatura de -40 °C a 110 °C</li> <li>• Sin ribonucleasa ni desoxirribonucleasa</li> </ul>	Proveedor de laboratorio general
Tubos de microcentrífuga, sin nucleasas (1,5, 1,7 o 2,0 ml, a menos que se especifique como 0,5 ml)	Proveedor de laboratorio general
Depósitos de reactivos libres de nucleasas, 50 ml o equivalente (PVC, cubeta desechable)	Proveedor de laboratorio general
Tubos cónicos de 15 ml	Proveedor de laboratorio general
Tubos cónicos de 50 ml	Proveedor de laboratorio general
Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles de 20 µl	Proveedor de laboratorio general
Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles de 200 µl	Proveedor de laboratorio general
Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles de 1000 µl	Proveedor de laboratorio general
Placas de almacenamiento de 96 pocillos, 0,8 ml (placa MIDI)	Thermo Fisher Scientific, n.º de pieza AB-0859 (o equivalente)
Placas de PCR de 96 pocillos de 0,2 ml (polipropileno sin ARNasa/ADNasa, unión baja)	Proveedor de laboratorio general
Cubo de hielo y hielo	No aplicable
Muestras de ADN genómico cuantificado	No aplicable

## Recopilación, transporte y almacenamiento de muestras



### PRECAUCIÓN

Manipule todas las muestras como si fueran agentes potencialmente infecciosos.

- Siga los procedimientos de seguridad, incluido el uso de EPP, al recoger, transportar, almacenar y procesar muestras de sangre humana.

- El transporte de sangre total debe cumplir con la regulación nacional, federal, estatal y local en materia de transporte de agentes etiológicos.
- Recoja 2–5 ml de sangre completa periférica en tubos de EDTA y consérvelos entre 2 °C y 8 °C durante un máximo de cinco semanas antes de la extracción.
- No se han observado efectos adversos en el rendimiento del ensayo con muestras de sangre completa con presencia elevada de bilirrubina, hemoglobina, triglicéridos, biotina o EDTA. Consulte Sustancias interferentes.
- TruSight Whole Genome es compatible con los kits de extracción disponibles en el mercado y con los protocolos adecuados para su uso en la secuenciación de próxima generación (NGS). Consulte [Evaluación del método de extracción de ADN, en la página 39](#).
- TruSight Whole Genome es compatible con el ADN eluido en una solución tamponada de Tris que contenga ≤10 mM de EDTA, como 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, pH 8,0 (TE).
- Se recomienda la elución y el almacenamiento del ADN en TE. Para mayor estabilidad, evite almacenarlo en agua.

## Recomendaciones de entrada de ADN

- Antes de comenzar el ensayo con TruSight Whole Genome, cuantifique el ADN genómico extraído de sangre completa mediante cualquier método de cuantificación fluorométrica que utilice fluoróforos de unión de ácido nucleico. Se recomienda que el ADN<sub>g</sub> de las muestras destinadas a un lote concreto de preparación de genotecas y a un experimento de secuenciación se cuantifique conjuntamente para eliminar la variabilidad entre lotes cuando sea posible, o que se utilicen controles del proceso para garantizar una variabilidad entre lotes de la cuantificación del ADN ≤25 %.
- Evite pipetear volúmenes de muestra pequeños (<2 µl) para garantizar una cuantificación y una entrada del ADN precisas.
- El TruSight Whole Genome Dx Library Prep requiere suficiente ADN para saturar los BLT-PF para una normalización automática eficaz de los rendimientos de la genoteca y un funcionamiento óptimo. Debido a la variación de los resultados de los distintos métodos de cuantificación, la siguiente tabla proporciona la entrada de ADN recomendada para tres métodos de cuantificación con el fin de garantizar un rendimiento óptimo del ensayo. El uso de otros métodos de cuantificación puede requerir optimización. Consulte [Sensibilidad de entrada de ADN, en la página 40](#).

Método de cuantificación	Target DNA Input (ng)	Concentración mínima de reservas de ADN
Kit de ensayo Quant-iT PicoGreen dsDNA	280	11,2 ng/µl
Kit de ensayo Qubit dsDNA Broad-Range (BR)	280	11,2 ng/µl

Método de cuantificación	Target DNA Input (ng)	Concentración mínima de reservas de ADN
Kit de cuantificación AccuClear Ultra High Sensitivity dsDNA	350	14 ng/μl

## Recomendaciones de competencia

La competencia del operador y la realización satisfactoria del ensayo pueden evaluarse realizando el flujo de trabajo completo una vez de acuerdo con las instrucciones de uso. Este flujo de trabajo se puede realizar con una única preparación de genoteca de 6 muestras y un experimento de secuenciación utilizando una celda de flujo S2 o una única preparación de genoteca de 16 muestras y un experimento de secuenciación utilizando una celda de flujo S4. El éxito se indica mediante la superación de los parámetros de control de calidad del experimento y de la genoteca registrados en el informe consolidado generado por el software TruSight Whole Genome Analysis Application. Consulte Guía de TruSight Whole Genome Analysis Application (n.º de documento 200049931).

Illumina recomienda la inclusión de muestras de ADN genómico extraídas de sangre completa periférica que cumplan los criterios de cualificación de concentración y volumen de reserva de ADN para demostrar la integración satisfactoria del ensayo con los procesos de laboratorio previos, como la recogida y el almacenamiento de muestras, y los procedimientos de extracción y cuantificación de ADN. También se pueden utilizar muestras de referencia de ADN genómico disponibles en el mercado derivadas de un único donante humano, como NA24385/HG002 (National Institute of Standards and Technology Genome in a Bottle Consortium).

Si surgen problemas, consulte la sección [Solución de problemas, en la página 75](#) para conocer las acciones recomendadas y póngase en contacto con el servicio técnico de Illumina.

## Advertencias y precauciones

- **Algunos componentes de este ensayo contienen productos químicos potencialmente peligrosos. Evite su inhalación, su ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que pueden provocar lesiones. 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 consultar las hojas de datos de seguridad (SDS), visite [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
- Comunique de inmediato cualquier incidente grave relacionado con este producto a Illumina y las autoridades competentes de los Estados miembros en los que se encuentren el usuario y el paciente.
- Manipule todas las muestras como si fueran infecciosas.

- Utilice las precauciones habituales del laboratorio. No pipetee con la boca. No coma, beba ni fume en las zonas de trabajo designadas. Use guantes desechables y batas de laboratorio para la manipulación de muestras y reactivos del ensayo. Lávese bien las manos tras la manipulación de muestras y reactivos del ensayo.
- Este ensayo contiene polietilenglicol. Evite su inhalación, su ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que pueden provocar lesiones.
- Este ensayo contiene hidróxido sódico. Evite su inhalación, su ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que pueden provocar lesiones.
- Los procedimientos de preparación de genotecas requieren un entorno libre de RNasa/DNasa. Descontamine a fondo las zonas de trabajo con una solución de limpieza que inhiba la RNasa/DNasa.
- Use tubos de microcentrífuga, placas, puntas de pipeta y depósitos libres de nucleasas.
- Use un equipo calibrado durante todo el ensayo. Asegúrese de calibrar el equipo a las velocidades, temperaturas y volúmenes especificados en este protocolo.
- Use pipetas de precisión para garantizar la administración precisa tanto del reactivo como de la muestra. Calibre de forma periódica según las especificaciones del fabricante.
- Asegúrese de usar el equipo especificado para el ensayo y de ajustar los programas según se indica.
- Las temperaturas especificadas para la incubadora de micromuestras indican la temperatura de reacción establecida, no necesariamente la temperatura del equipo.
- No intercambie los componentes del kit de lotes de TruSight Whole Genome Dx Library Prep distintos. Los lotes se identifican con la etiqueta de la caja.
- Se precisan prácticas de laboratorio adecuadas para evitar que las nucleasas y los productos de PCR contaminen los reactivos, los instrumentos, las muestras y las genotecas. La contaminación de nucleasas y productos de PCR puede dar lugar a resultados imprecisos y poco fiables.
- Para un almacenamiento y un rendimiento del ensayo óptimos, es preciso usar el tipo de placa adecuado. Asegúrese de seguir las instrucciones para la transferencia de placas en las [Instrucciones de uso, en la página 17](#).
- Puede producirse contaminación cruzada o pérdida de muestras si los sellos de la placa no se aplican o retiran con cuidado (consulte [Manipulación de las placas de preparación de genotecas, en la página 15](#)).
- El incumplimiento de los procedimientos descritos puede provocar resultados erróneos o una reducción considerable de la calidad de las genotecas.
- Almacene los reactivos o componentes de ensayo a la temperatura especificada.
- No almacene los reactivos en una unidad de almacenamiento sin congelación.
- No use reactivos que se hayan almacenado incorrectamente.
- No utilice ningún componente más allá de su fecha de caducidad indicada.
- Prepare el 0.2N NaOH (HP3 diluido) nuevo el día de uso y deseche el volumen restante después de su uso.

- Prepare etanol nuevo al 80 % con agua libre de RNasa/DNasa el día de su uso. El etanol puede absorber agua del aire, lo que podría afectar a los resultados. Deseche el etanol al 80 % después de su uso en virtud de la regulación local, estatal o federal. Utilice etanol para biología molecular.

## Notas del procedimiento

### Sugerencias y técnicas

#### Procedimientos para evitar la contaminación cruzada

- Cuando añada o transfiera muestras, cambie las puntas entre *cada muestra*.
- Cuando añada adaptadores o cebadores de índices con una pipeta multicanal, cambie las puntas entre *cada pocillo*.
- Selle y quite la junta de las placas cuidadosamente sobre una mesa de trabajo para evitar la contaminación cruzada de las muestras.
- Para evitar la contaminación, cada pocillo de índice es de un solo uso.
- Utilice los volúmenes de cubeta indicados y no vierta el volumen restante de la cubeta de nuevo en los tubos de reserva, ya que esto puede provocar contaminación. Hay suficiente volumen para soportar el flujo de trabajo.
- No mezcle genotecas de diferentes preparaciones.

#### Precisión del pipeteado

Use las siguientes directrices a la hora de usar las pipetas multicanal:

- Asegúrese de que las puntas de barrera encajen debidamente y que son adecuadas para la marca y el modelo de la pipeta multicanal.
- Fije las puntas con un movimiento giratorio para asegurarse de que todas queden fijadas correctamente.
- Aspire con niveles de líquido de volumen iguales en todas las puntas.
- Pipetee las soluciones viscosas (BLT-PF,CB,ELM,TWB2) lentamente.
- Después de la dispensación, asegúrese de que el líquido se haya dispensado de cada punta.

#### Evitar la formación de espuma

- Pipetee lentamente e invierta para mezclar. No agite en vórtex la ELM ni el TWB2.

#### Manipulación de placas de índice

- Perfore el sello de aluminio solo de los índices que se utilizarán.
- Manipule la placa por los bordes y evite tocar el sello de aluminio con cualquier otra cosa que no sean puntas de pipeta limpias.
- No reutilice los pocillos perforados.

- Deseche el volumen no utilizado (aproximadamente 30  $\mu$ l) después del uso de los pocillos perforados de la placa de índices y coloque el sello sobre los pocillos perforados para evitar la contaminación cruzada.
- No coloque el sello sobre los pocillos no utilizados, ya que esto interfiere con la perforación.

## **Manipulación de las placas de preparación de genotecas**

- Selle siempre la placa antes de almacenarla, agitarla, incubarla o centrifugarla.
- Para sellar la placa, aplíquela la cubierta adhesiva con una cuña o un rodillo de sellado.
- Asegúrese de que los bordes y los pocillos estén completamente sellados para reducir el riesgo de contaminación cruzada y evaporación.
- Selle siempre las placas con un sello adhesivo para placas nuevo. No reutilice los sellos.
- Coloque la placa en una superficie plana antes de retirar el sello con cuidado.
- Si no se especifica lo contrario, se pueden realizar pasos con la placa dentro o fuera del imán.

## **Transferencias de placa**

- Cuando transfiera volúmenes entre placas, transfiera el volumen especificado desde cada pocillo de la placa de origen al pocillo correspondiente de la placa de destino.

## **Cubetas**

- Las cubetas de reactivos pueden utilizarse donde se indique. Utilice las siguientes pautas:
  - Prepare la cubeta con CB después de agitar en vórtex. No es necesario devolver las CB al tubo y agitar antes del segundo paso de adición de bolas.
  - Etiquete las cubetas TWB2 y RSB para evitar confusiones.
  - Deseche los reactivos cuando esté indicado o al final del flujo de trabajo.
- Utilice el volumen recomendado. Los volúmenes recomendados incluyen un excedente de 1 ml para el volumen muerto.
- El RSB y el TWB2 están envasados en tubos similares. Lea atentamente cada etiqueta antes del uso.

## **Centrifugación**

- Centrifugue solo en los pasos indicados del procedimiento para consolidar el líquido o las bolas en el fondo del pocillo para evitar pérdidas de la muestra.

## **Manipulación de las bolas**

- No congele las Cleanup Beads (CB).
- Cuando lave las bolas:
  - Utilice el soporte magnético para 96 pocillos con todas las placas MIDI.
  - Dispense el líquido de modo que no quede ninguna bola adherida al lateral del pocillo.
  - Mantenga la placa en el soporte magnético.
- Añada siempre los reactivos al centro o al fondo del pocillo sin alterar la microesfera de bolas. No añada reactivos a la parte superior del pocillo.
- Pipetee las suspensiones de bolas lentamente.

- Agite en vórtex las bolas hasta que estén bien dispersas. El color del líquido debe parecer homogéneo. Agite en vórtex cuando se especifique en el protocolo para asegurarse de que las bolas se resuspendan en el momento del uso.
- Si las bolas no se resuspenden, agítelas de nuevo.
- Si se aspiran las bolas con las puntas de las pipetas cuando no corresponde, dispense las reacciones en la placa con el soporte magnético y espere hasta que el líquido se vuelva transparente (aproximadamente 2 minutos).
- Almacene las bolas en posición vertical para asegurarse de que estén sumergidas en el tampón cuando vuelva a guardarlas después de usarlas.

## Controles

TruSight Whole Genome utiliza controles analíticos integrados en el software TruSight Whole Genome Analysis Application para la calificación de datos y no requiere el uso de controles de lotes externos. Consulte [Controles de calidad, en la página 35](#) para obtener más información sobre las especificaciones de los parámetros.

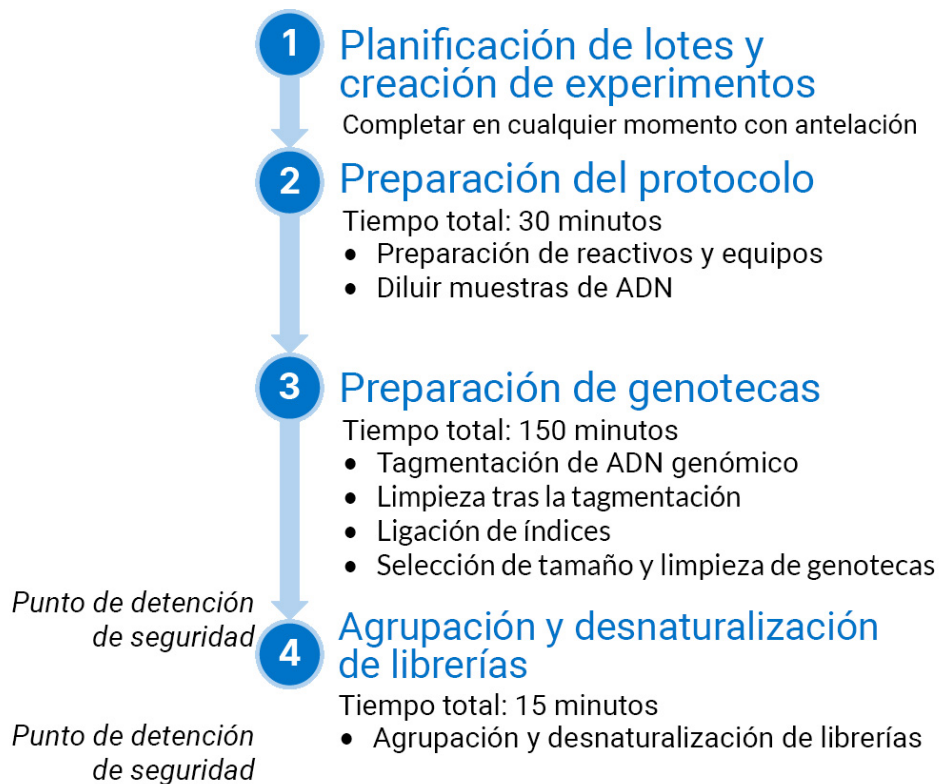


# Instrucciones de uso

## Flujo de trabajo de TruSight Whole Genome Dx Library Prep

El siguiente diagrama ilustra el flujo de trabajo de TruSight Whole Genome Dx Library Prep. Los puntos de detención de seguridad se marcan entre los pasos.

Si se detiene, devuelva los reactivos restantes a los tubos originales a la temperatura de almacenamiento indicada en [Reactivos suministrados, en la página 6](#). Si continúa, pase a la siguiente sección del protocolo con los reactivos preparados.



## Planificación de lotes y creación de experimentos

Planifique el número de genotecas de muestras para el lote, y la indexación y agrupación para los experimentos de secuenciación.

TruSight Whole Genome se ha evaluado y se ha demostrado su rendimiento para cuatro juegos de índices para la celda de flujo S2 ([Figura 1, Tabla 4](#)) y dos juegos de índices para la celda de flujo S4 ([Figura 2, Tabla 5](#)). El software impone el uso de juegos de índices específicos. No mezcle ni combine los juegos de índices especificados.

No se admite la plexicidad de la secuenciación fuera de estas recomendaciones.

Los juegos de índices S2 y S4 admiten tamaños de lote de preparación de genotecas de 6, 12, 16, 18, 22 y 24 muestras. Utilice los juegos de índices compatibles enumerados en la [Tabla 3](#) para cada tamaño de lote de preparación de genoteca.



### PRECAUCIÓN

Organice las muestras en la placa utilizando una orientación que coincida con la indexación planificada, es decir, las filas A a H para 16 unidades de plexado, o las filas A a F para 6 unidades de plexado. Añada los índices utilizando una pipeta multicanal para evitar saltarse un pocillo o añadir dos juegos de índices a una misma muestra, lo que puede provocar que no se obtengan resultados o que se obtengan resultados falsos, respectivamente.

Tabla 3 Opciones del juego de índices para el lote de preparación de genotecas

Tamaño del lote de preparación de genotecas	Juego de índices	Configuraciones de la celda de flujo
6 muestras	Juego de índices S2 1, 2, 3 o 4 (elija cualquier juego)	S2 x 1
12 muestras	Juego de índices S2 1, 2, 3 o 4 (elija 2 juegos)	S2 x 2
18 muestras	Juego de índices S2 1, 2, 3 o 4 (elija tres juegos)	S2 x 3
24 muestras	Juego de índices S2 1, 2, 3 y 4	S2 x 4
16 muestras	Juego de índices S4 1 o 2	S4 x 1
22 muestras	Juego de índices S4 1 + juego de índices S2 3 o 4	S4 x 1 y S2 x 1
	Juego de índices S4 2 + juego de índices S2 1 o 2	

Figura 1 Disposición de la placa de índices que muestra cuatro juegos de índices para la secuenciación de células de flujo S2

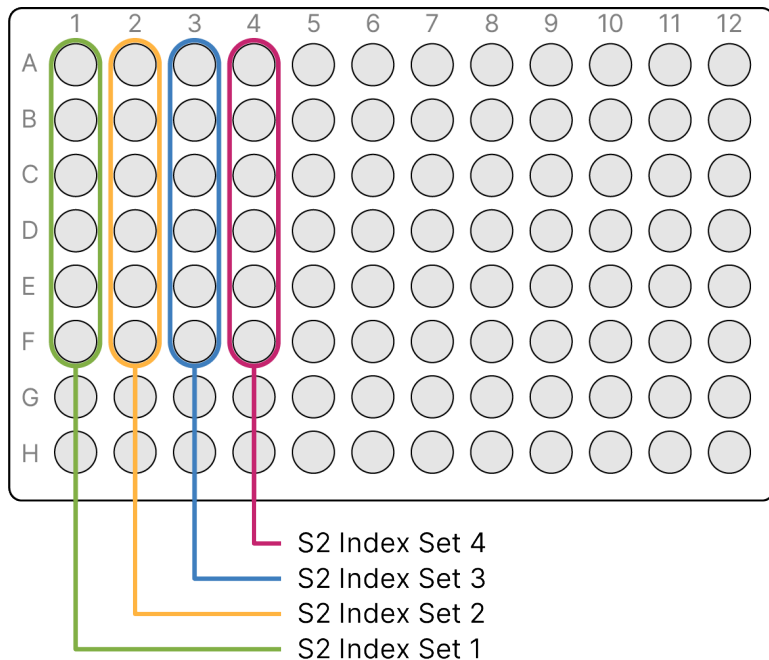


Tabla 4 Juegos de índices S2 para celda de flujo S2

	<b>Juego de índices S2 1 (verde)</b>	<b>Juego de índices S2 2 (amarillo)</b>	<b>Juego de índices S2 3 (azul)</b>	<b>Juego de índices S2 4 (magenta)</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>A</b>	UDP0037	UDP0065	UDP0081	UDP0089
<b>B</b>	UDP0038	UDP0066	UDP0082	UDP0090
<b>C</b>	UDP0039	UDP0067	UDP0083	UDP0091
<b>D</b>	UDP0040	UDP0068	UDP0084	UDP0092
<b>E</b>	UDP0041	UDP0069	UDP0085	UDP0093
<b>F</b>	UDP0042	UDP0070	UDP0086	UDP0094

Figura 2 Disposición de la placa de índices que muestra dos juegos de índices para la secuenciación de células de flujo S4

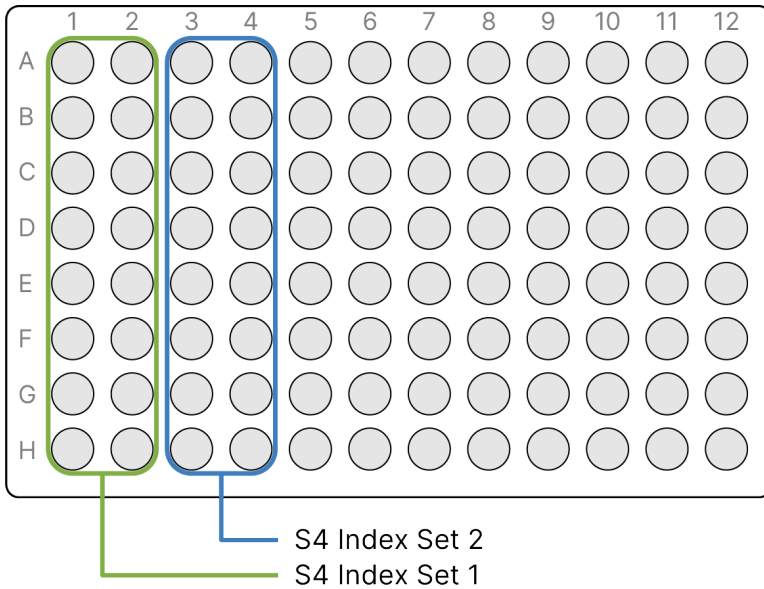


Tabla 5 Juegos de índices S4 para celda de flujo S4

	Juego de índices S4 1 (verde)		Juego de índices S4 2 (azul)	
	1	2	3	4
<b>A</b>	UDP0037	UDP0065	UDP0081	UDP0089
<b>B</b>	UDP0038	UDP0066	UDP0082	UDP0090
<b>C</b>	UDP0039	UDP0067	UDP0083	UDP0091
<b>D</b>	UDP0040	UDP0068	UDP0084	UDP0092
<b>E</b>	UDP0041	UDP0069	UDP0085	UDP0093
<b>F</b>	UDP0042	UDP0070	UDP0086	UDP0094
<b>G</b>	UDP0043	UDP0071	UDP0087	UDP0095
<b>H</b>	UDP0044	UDP0072	UDP0088	UDP0096

Registre el nombre del lote único y los datos de la muestra, incluidos el ID de la muestra, el ID del pocillo de la placa indicadora asociada (consulte el [Apéndice A, en la página 90](#)), la placa de la genoteca, el ID del pocillo de la placa de la genoteca y el ID del tubo de la genoteca (si se conoce). Esta información se introduce durante la creación del experimento.

Para obtener instrucciones sobre cómo utilizar la aplicación para crear experimentos, consulte Guía de TruSight Whole Genome Analysis Application (n.º de documento 200049931). Registre el nombre de la serie que se utilizará durante la carga de consumibles.

**PRECAUCIÓN**

Asegúrese de que los índices y las muestras asociadas utilizadas durante la preparación de la genoteca coincidan con los registrados y utilizados para crear el experimento. Las discrepancias pueden provocar la notificación de resultados incorrectos o la ausencia de resultados.

## Preparación del protocolo

### Preparación de reactivos y equipos

Si tiene previsto secuenciar el mismo día, descongele los consumibles de secuenciación con antelación. Consulte Documentación de NovaSeq 6000Dx Instrument (documento #200010105) para obtener instrucciones detalladas.

1. Precaliente una incubadora de micromuestras con un inserto de placa MIDI a 47 °C.
2. Retire los siguientes reactivos de la caja y descongélalos de la siguiente manera.

Tabla 6 Almacenamiento entre -25 °C y -15 °C

Reactivo	Nombre de la caja	Instrucciones de descongelación
BLT-PF	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Descongele a temperatura ambiente durante 30 minutos.
ELM	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Descongele a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, manténgalo en hielo hasta que sea necesario.
HP3	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Descongele a temperatura ambiente durante 30 minutos.
TB1	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Descongele a temperatura ambiente durante 30 minutos.
Índices UD	TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes	Descongele a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Tabla 7 Almacenamiento entre 15 °C y 30 °C

Reactivo	Nombre de la caja	Instrucciones de descongelación
CB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Úselo a temperatura ambiente.
RSB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Úselo a temperatura ambiente.
ST2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Úselo a temperatura ambiente.
TWB2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Úselo a temperatura ambiente.
NB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Úselo a temperatura ambiente.



## PRECAUCIÓN

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. 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](https://support.illumina.com/sds.html).

## Preparación de las muestras de ADN

Prepare los siguientes consumibles.

- Muestras de ADN<sub>g</sub> cuantificadas:
  - a. Deje que alcance la temperatura ambiente.
  - b. Centrifugue brevemente para recoger las gotas.
  - c. Agite en vórtex o pipetee para mezclar, y luego centrifugue brevemente.
- RSB: agite en vórtex o invierta para mezclar. Mantener a temperatura ambiente.
  - El RSB y el TWB2 están envasados en tubos similares. Lea atentamente cada etiqueta antes del uso.

## Procedimiento

Dependiendo de la entrada de ADN, que varía en función del método de cuantificación de ADN utilizado, calcule los volúmenes necesarios para preparar muestras de ADN diluidas. A continuación se proporcionan fórmulas para los tres métodos de cuantificación de ADN analizados. Consulte [Recomendaciones de entrada de ADN, en la página 11](#) y [Apéndice B, en la página 93](#) para obtener más información.

Los cálculos suponen un volumen mínimo de pipeteado de 2,0 µl e incluyen un excedente del 10 %. El redondeo debe realizarse en los últimos pasos, después de completar los cálculos, utilizando el número necesario de decimales para garantizar un pipeteado preciso.

### Opción 1: entrada de ADN de 280 ng para métodos de cuantificación de amplio rango Qubit y Quant

La concentración mínima de la reserva de ADN de la muestra es de 11,2 ng/µl. Es más probable que las muestras <11,2 ng/µl no superen el CC de la genoteca después de la secuenciación. En función de la concentración de la reserva de ADN, utilice una de las siguientes ecuaciones para realizar cálculos.

1. Para una concentración de la reserva de ADN de 11,2 a 154,0 ng/µl, calcule el volumen de la reserva de ADN y RSB necesario utilizando un volumen total de ADN diluido de 27,5 µl (25 µl más 10 % de excedente) como constante:
  - a. Calcule el volumen de la reserva de ADN:

$$\begin{aligned} \text{Volumen de reserva de ADN } (\mu\text{l}) &= \frac{(\text{objetivo de ADN de entrada (ng)} + \text{excedente del 10 \%})}{\text{concentración de reserva de ADN (ng}/\mu\text{l})} \\ &= 280 \text{ ng} \times 1,1 / \text{concentración de reserva de ADN (ng}/\mu\text{l}) \\ &= 308 \text{ ng} / \text{concentración de reserva de ADN (ng}/\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- b. Calcule el volumen de la reserva de RSB:

$$\begin{aligned} \text{Volumen de RSB } (\mu\text{l}) &= \text{Volumen total de ADN diluido } (\mu\text{l}) - \text{volumen de reserva de ADN calculado } (\mu\text{l}) \\ &= 27,5 (\mu\text{l}) - \text{volumen de reserva de ADN calculado } (\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- c. Verifique los cálculos: Confirme el volumen de la reserva de ADN calculado ( $\mu\text{l}$ ) + el volumen calculado de RSB ( $\mu\text{l}$ ) = 27,5  $\mu\text{l}$ , el volumen total de ADN diluido (una constante, 25  $\mu\text{l}$  más un excedente del 10 %).

2. De forma alternativa, para las concentraciones de la reserva de ADN >154,0 ng/ $\mu\text{l}$ , calcule el volumen total de ADN diluido y RSB necesario utilizando el volumen de la reserva de ADN 2,0  $\mu\text{l}$  y la concentración de reserva de ADN diluida diana con 11,2 ng/ $\mu\text{l}$  como constantes.

- a. Calcule el volumen total de ADN diluido:

$$\begin{aligned} \text{Volumen total de ADN diluido } (\mu\text{l}) &= \frac{\text{concentración de ADN de reserva (ng}/\mu\text{l}) \times \text{el volumen de ADN de reserva } (\mu\text{l})}{\text{Concentración objetivo de ADN de reserva diluido}} \\ &= \text{concentración de ADN de reserva (ng}/\mu\text{l}) \times 2,0 \mu\text{l} / 11,2 \text{ ng}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

- b. Calcule el volumen de RSB:

$$\begin{aligned} \text{Volumen de RSB } (\mu\text{l}) &= \text{Volumen total calculado de ADN diluido } (\mu\text{l}) - \text{Volumen de reserva de ADN } (\mu\text{l}) \\ &= \text{Volumen total calculado de ADN diluido } (\mu\text{l}) - 2,0 \mu\text{l} \end{aligned}$$

- c. Verifique los cálculos: Confirme el volumen total de ADN diluido ( $\mu\text{l}$ ) - el volumen calculado de RSB ( $\mu\text{l}$ ) = 2,0  $\mu\text{l}$ , el volumen de la reserva de ADN (una constante).

Continúe con el paso 3 a continuación.

## Opción 2: entrada de ADN de 350 ng para el método de cuantificación de sensibilidad ultra alta Accuclear

La concentración mínima de la reserva de ADN de la muestra es de 14,0 ng/ $\mu\text{l}$ . Es más probable que las muestras <14,0 ng/ $\mu\text{l}$  no superen el CC de la genoteca después de la secuenciación. En función de la concentración de la reserva de ADN, utilice una de las siguientes ecuaciones para realizar cálculos.

1. Para una concentración de la reserva de ADN de 14,0 a 192,5 ng/ $\mu\text{l}$ , calcule el volumen de reserva de ADN y RSB necesario utilizando un volumen total de ADN diluido de 27,5  $\mu\text{l}$  (25  $\mu\text{l}$  más 10 % de excedente) como constante:

- a. Calcule el volumen de la reserva de ADN:

$$\begin{aligned} \text{Volumen de reserva de ADN } (\mu\text{l}) &= \frac{(\text{objetivo de ADN de entrada (ng)} + \text{excedente del 10 \%})}{\text{concentración de reserva de ADN (ng}/\mu\text{l})} \\ &= 350 \text{ ng} \times 1,1 / \text{concentración de reserva de ADN (ng}/\mu\text{l}) \\ &= 385 \text{ ng} / \text{concentración de reserva de ADN (ng}/\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- b. Calcule el volumen de la reserva de RSB:

$$\text{Volumen de RSB } (\mu\text{l}) = \text{Volumen total de ADN diluido } (\mu\text{l}) - \text{volumen de reserva de ADN calculado } (\mu\text{l}) \\ = 27,5 (\mu\text{l}) - \text{volumen de reserva de ADN calculado } (\mu\text{l})$$

- c. Verifique los cálculos: Confirme el volumen de la reserva de ADN calculado ( $\mu\text{l}$ ) + el volumen calculado de RSB ( $\mu\text{l}$ ) = 27,5  $\mu\text{l}$ , el volumen total de ADN diluido (una constante, 25  $\mu\text{l}$  más un excedente del 10 %).
2. Como alternativa, para concentraciones de la reserva de ADN >192,5 ng/ $\mu\text{l}$ , calcule el volumen total de ADN diluido y RSB necesario utilizando el volumen de la reserva de ADN de 2,0  $\mu\text{l}$  como constante.

- a. Calcule el volumen total de ADN diluido:

$$\text{Volumen total de ADN diluido } (\mu\text{l}) = \frac{\text{concentración de reserva de ADN (ng}/\mu\text{l}) \times 2,0 \mu\text{l}}{14,0 \text{ ng}/\mu\text{l}}$$

- b. Calcule el volumen de RSB:

$$\text{Volumen de RSB } (\mu\text{l}) = \text{volumen total de ADN diluido } (\mu\text{l}) - \text{volumen de reserva de ADN } (\mu\text{l}) \\ = \text{volumen total } (\mu\text{l}) - 2,0 \mu\text{l}$$

- c. Verifique los cálculos: Confirme el volumen total de ADN diluido ( $\mu\text{l}$ ) - el volumen calculado de RSB ( $\mu\text{l}$ ) = 2,0  $\mu\text{l}$ , el volumen de la reserva de ADN (una constante).
3. Etiquete un nuevo tubo de microcentrífuga de 0,5 ml para cada muestra diluida.
4. Añada el volumen de RSB calculado anteriormente al tubo correspondiente para cada muestra diluida.
5. Añada el volumen de la reserva de ADN calculado anteriormente al tubo correspondiente para cada muestra diluida.
6. Pulse el vórtex y, a continuación, centrifugue brevemente.

## Preparación de genotecas

Utilice los pasos de preparación de esta sección para preparar los reactivos con antelación.

A menos que se haya indicado un punto de parada de seguridad, continúe inmediatamente con el siguiente paso.

### Preparación

Prepare los siguientes consumibles:

- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free): agite en vórtex para mezclar. Si utiliza varios tubos, agite en el vórtex para mezclarlos y después combínelos.
- TB1 (Tagmentation buffer 1):
  - a. Agite en un mezclador vorticial para mezclar.
  - b. Centrifugue brevemente.
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2):
  - a. Inspeccione en busca de precipitados. Si se observan precipitados, caliente a una temperatura de 37 °C durante 10 minutos y, a continuación, agite en vórtice hasta que se disuelvan los precipitados.



- b. Agite en vórtex a fondo y, a continuación, centrifugue brevemente.
- ELM (Extension-Ligation Mix):
  - a. Invierta para mezclar. No lo agite en un mezclador vorticial.
  - b. Conservar en hielo hasta su uso.
- HP3 (2N NaOH):
  - a. Agite en vórtice y, a continuación, centrifugue brevemente.
  - b. Mantener a temperatura ambiente.
- NB (Neutralization Buffer):
  - a. Agite en vórtice y, a continuación, centrifugue brevemente.
  - b. Mantener a temperatura ambiente.
- CB (Cleanup Beads):
  - a. Agite en vórtex durante 1 minuto.
  - b. Invierta de 2 a 5 veces y luego agite bien para resuspender.
- Adaptadores de índices (UDI PCR-Free (32 Indexes)):
  - a. Agite en vórtice y, a continuación, centrifugue brevemente.
  - b. Mantener a temperatura ambiente.
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2):
  - a. Etiquete el tapón del tubo de TWB2.
  - b. Invierta bien para mezclar.
- En un tubo de microcentrífuga etiquetado como 0.2N NaOH, combine los siguientes volúmenes para preparar el 0.2N NaOH según el tamaño de lote planificado. Agite en un mezclador vorticial para mezclar.

**NOTA** Si planea agrupar y desnaturalizar genotecas el mismo día, prepare más 0.2N NaOH. Consulte [Preparación, en la página 32](#).

Reactivo	6 muestras ( $\mu$ l)	12 muestras ( $\mu$ l)	16 muestras ( $\mu$ l)	18 muestras ( $\mu$ l)	22 muestras ( $\mu$ l)	24 muestras ( $\mu$ l)
HP3	30	60	80	90	110	120
RSB	270	540	720	810	990	1080

- En un tubo cónico de 15 ml, combine los siguientes volúmenes para preparar EtOH al 80 % de acuerdo con el tamaño de lote previsto. Se incluye el excedente para el uso de la cubeta. Agite en un mezclador vorticial para mezclar.

Reactivo	6 muestras (ml)	12 muestras (ml)	16 muestras (ml)	18 muestras (ml)	22 muestras (ml)	24 muestras (ml)
Etanol al 100 %, puro (nivel de calidad 200)	4	8	8	12	12	12
Agua sin nucleasas	1	2	2	3	3	3



### PRECAUCIÓN

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. 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](http://support.illumina.com/sds.html).

## Tagmentación de ADN genómico

En este paso, se usa el Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF) para tagmentar el ADN, que es un proceso que fragmenta y etiqueta el ADN con secuencias de adaptadores.

### Consumibles

- Placa MIDI de 96 pocillos
- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free)
- Tagmentation buffer 1 (TB1)
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)

## Procedimiento

1. Confirme que la incubadora de micromuestras con el inserto de placa MIDI está precalentada a 47 °C.
2. Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como LP1 (Library Plate 1).
3. Designe y registre los ID de los pocillos de muestra para la tagmentación de las muestras de ADN diluido y los reactivos.
4. Transfiera 25 µl de ADN de muestra diluido a cada pocillo.
5. Añada 10 µl de TB1 a cada pocillo.
6. Agite en vórtex los BLT-PF enérgicamente durante 1 minuto para resuspender. No centrifugue. Repita según sea necesario.
7. Añada 15 µl de BLT-PF a cada pocillo.
8. Selle y agite la LP1 a 1800 rpm durante 1 minuto.
9. Incube la LP1 en la incubadora de micromuestras precalentada a 47 °C durante 8 minutos.

**NOTA** Es de esperar una ligera condensación en la junta de la placa. No centrifugue.

10. Retire el sello y añada 10 µl de ST2 a cada pocillo.
11. Selle y agite la LP1 a 1800 rpm durante 1 minuto y luego continúe con el siguiente paso.

## Limpieza tras la tagmentación

Los siguientes pasos eliminan el ADN no unido y realizan el intercambio del tampón para prepararse para el siguiente paso.

## Consumibles

- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2)
- Cubeta

## Acerca de los reactivos

- Pipetee el TWB2 lentamente para minimizar la formación de espuma.
- El RSB y el TWB2 están envasados en tubos similares. Lea atentamente cada etiqueta antes del uso.

## Procedimiento

1. Retire el sello, coloque la LP1 en el soporte magnético y espere hasta que el líquido esté transparente (2 minutos).
2. Prepare la cubeta de TWB2 con los volúmenes indicados en la tabla siguiente y etiquete claramente la cubeta TWB2. Los volúmenes incluyen un excedente de 1 ml para el volumen muerto. Guarde la cubeta para pasos posteriores.

Reactivo	6 muestras ( $\mu$ l)	12 muestras ( $\mu$ l)	16 muestras ( $\mu$ l)	18 muestras ( $\mu$ l)	22 muestras ( $\mu$ l)	24 muestras ( $\mu$ l)
TWB2	3700	6400	8200	9100	10900	11800

3. Con la LP1 en el soporte magnético, use una pipeta multicanal ajustada a 60  $\mu$ l para retirar y desechar el sobrenadante de cada pocillo sin alterar la microesfera de bolas.
4. Utilizando una pipeta multicanal, añada 150  $\mu$ l de TWB2 a cada pocillo.
5. Selle y agite la LP1 a 1800 rpm durante 1 minuto.
6. Retire el sello, coloque la LP1 en el soporte magnético y espere hasta que el líquido esté transparente (2 minutos).
7. Vuelva a congelar la BLT-PF durante la incubación y continúe con el siguiente paso.

## Ligación de índices

En esta sección, los usuarios ligan los adaptadores de índices dobles únicos a cada muestra de acuerdo con la indexación planificada durante la [Planificación de lotes y creación de experimentos, en la página 17](#).

## Consumibles

- ELM (Extension-Ligation Mix)
- Adaptadores de índices (UDI PCR-Free (32 Indexes))
- Cubeta de TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2)
- 0.2N NaOH (HP3 diluido)

## Acerca de los reactivos

- Los pocillos de la placa de índices no se pueden reutilizar.
- Aspire y dispense la ELM lentamente debido a la viscosidad de la solución.
- El RSB y el TWB2 están envasados en tubos similares. Lea atentamente cada etiqueta antes del uso.

## Procedimiento

1. Mantenga la LP1 en el soporte magnético y complete los siguientes pasos:
  - a. Utilice una pipeta multicanal ajustada a 150  $\mu$ l para retirar y desechar el sobrenadante de cada pocillo.
  - b. Sin alterar la microesfera de bolas, use una pipeta ajustada a 20  $\mu$ l para retirar y desechar los residuos de TWB2 de cada pocillo.
  - c. Añada 45  $\mu$ l de ELM a cada pocillo.
  - d. Perfore el sello de aluminio de la placa adaptadora de índices en cada uno de los pocillos de índices planificados utilizando una pipeta multicanal P200 y puntas de pipeta nuevas. Para evitar la contaminación, utilice una punta de pipeta nueva para cada pocillo.

- e. Añada adaptadores de índices de 5 µl a los pocillos de muestra correspondientes de la LP1 de acuerdo con los índices seleccionados durante la planificación del lote utilizando una pipeta multicanal P-10 o P-20.
2. Selle y agite la LP1 a 1800 rpm durante 1 minuto.
3. Incube la LP1 en la incubadora de micromuestras precalentada a 47 °C durante 8 minutos.

**NOTA** Es de esperar una ligera condensación en la junta de la placa. No centrifugue.

4. Vuelva a congelar la ELM durante la incubación.
5. Retire el sello, coloque la LP1 en el soporte magnético y espere hasta que el líquido esté transparente (2 minutos).
6. Con la LP1 en el soporte magnético, use una pipeta multicanal ajustada a 50 µl para retirar y desechar el sobrenadante de cada pocillo sin alterar la microesfera de bolas.
7. Lave las bolas de la siguiente manera.
  - a. Añada 150 µl de TWB2 a las bolas de cada pocillo utilizando una pipeta multicanal.
  - b. Selle y agite la LP1 a 1800 rpm durante 1 minuto.
  - c. Retire el sello, coloque la LP1 en el soporte magnético y espere hasta que el líquido esté transparente (2 minutos).
  - d. Con la LP1 en el soporte magnético, use una pipeta multicanal ajustada a 150 µl para retirar y desechar el sobrenadante de cada pocillo sin alterar la microesfera de bolas.
8. Lave las bolas una **segunda** vez.
9. Con la LP1 en el soporte magnético, use una pipeta multicanal ajustada a 20 µl para retirar y desechar los residuos de TWB2 de cada pocillo sin alterar la microesfera de bolas.
10. Añada 45 µl de 0.2N NaOH preparado previamente a cada pocillo.
11. Selle y agite la LP1 a 1800 rpm durante 1 minuto y luego continúe con la siguiente sección.

## Selección de tamaño y limpieza de genotecas

En este paso se utiliza una selección de genotecas bilateral. En el primer paso, se añaden Cleanup Beads a las genotecas eluidas y las bolas de BLT-PF. A continuación, el sobrenadante que contiene la genoteca eluida de una sola cadena se transfiere a una nueva placa mientras que los fragmentos demasiado grandes se quedan atrás. En el segundo paso, se añaden Cleanup Beads a las genotecas transferidas y se eliminan los fragmentos demasiado pequeños. A continuación, las genotecas se eluyen y se transfieren a la placa final de genotecas (FLP).

## Consumibles

- Placa MIDI de 96 pocillos
- Cubetas (3)
- Placa de PCR

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Etanol al 80 % de nueva preparación (EtOH al 80 %)

## Preparación

1. Agite la CB en vórtex y, a continuación, invierta hasta la completa resuspensión.
2. Prepare la cubeta de CB con los volúmenes indicados en la tabla siguiente y etiquete la cubeta CB. Los volúmenes son suficientes para ambos pasos de adición e incluyen un excedente de 1 ml en la cubeta para el volumen muerto mínimo. No es necesario mezclar entre los pasos de adición de CB. Las bolas permanecerán dispersas durante todo el procedimiento.

Reactivo	6 muestras ( $\mu$ l)	12 muestras ( $\mu$ l)	16 muestras ( $\mu$ l)	18 muestras ( $\mu$ l)	22 muestras ( $\mu$ l)	24 muestras ( $\mu$ l)
CB	1480	1960	2280	2440	2760	2920

## Procedimiento

1. Retire el sello y añada 40  $\mu$ l de CB a los pocillos de la placa LP1 MIDI que contiene BLT-PF y 0.2N NaOH.
2. Selle y agite la LP1 a 1800 rpm durante 1 minuto.
3. Incube la LP1 fuera del soporte magnético a temperatura ambiente durante 2 minutos.
4. Retire el sello, coloque la LP1 en el soporte magnético y espere hasta que el líquido esté transparente (5 minutos).
5. Mientras la placa se incubaba, etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como LP2.
6. *Transfiera* 80  $\mu$ l de sobrenadante de LP1 mientras está en el soporte magnético a los pocillos correspondientes de LP2 utilizando una pipeta multicanal.
7. Añada 40  $\mu$ l de CB a cada pocillo de la placa MIDI LP2.
8. Selle y agite la LP2 a 1800 rpm durante 1 minuto.
9. Deseche la placa MIDI LP1.
10. Incube la LP2 fuera del soporte magnético a temperatura ambiente durante 2 minutos.
11. Retire el sello, coloque la LP2 en el soporte magnético y espere hasta que el líquido esté transparente (5 minutos).
12. Con la LP2 en el soporte magnético, use una pipeta multicanal ajustada a 120  $\mu$ l para retirar y desechar el sobrenadante de cada pocillo sin alterar la microesfera de bolas.
13. Vierta EtOH al 80 % preparado previamente en una cubeta etiquetada y lave las bolas con LP2 en el imán de la siguiente manera.
  - a. Añada 180  $\mu$ l de EtOH al 80 % utilizando una pipeta multicanal.
  - b. Espere 30 segundos.

- c. Use una pipeta ajustada a 180 µl para retirar y desechar todo el sobrenadante de cada pocillo sin alterar la microesfera de bolas.
14. Lave las bolas una **segunda** vez.
  15. Con la LP2 en el soporte magnético, use una pipeta multicanal ajustada a 20 µl para retirar y desechar los residuos de EtOH de cada pocillo sin alterar la microesfera de bolas.
  16. Mantenga la LP2 en el soporte magnético durante 4 minutos para que se seque al aire.
  17. Deseche el EtOH al 80 % no utilizado y la cubeta.
  18. Prepare la cubeta de RSB con los volúmenes indicados en la tabla siguiente y etiquete la cubeta RSB. Los volúmenes incluyen un excedente de 1 ml para el volumen muerto.

Reactivo	6 muestras (µl)	12 muestras (µl)	16 muestras (µl)	18 muestras (µl)	22 muestras (µl)	24 muestras (µl)
RSB	1390	1780	2040	2170	2430	2560

19. Añada 65 µl de RSB a las bolas de cada pocillo.
20. Selle y agite la LP2 a 1800 rpm durante 1 minuto.
21. Incube la LP2 a temperatura ambiente durante 2 minutos.
22. Retire el sello, coloque la LP2 en el soporte magnético y espere hasta que el líquido esté transparente (2 minutos).
23. Etiquete una nueva placa de PCR con FLP (placa de genoteca final) y con el nombre del lote utilizado al crear el experimento.
24. *Transfiera* 60 µl de sobrenadante de LP2 mientras está en el soporte magnético a los pocillos correspondientes de FLP utilizando una pipeta multicanal.



### PRECAUCIÓN

El sobrenadante contiene la genoteca final y se utilizará durante el paso de agrupación y desnaturalización. No lo deseche.

25. Deseche todas las cubetas junto con los reactivos no utilizados en las cubetas.
26. Deseche la placa MIDI LP2.

### PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si se detiene, selle la placa final de la genoteca (FLP) con Microseal B y consérvela entre -25 °C y -15 °C durante un máximo de 14 días.

## Agrupación y desnaturalización de librerías

En esta sección, los usuarios crean los grupos planificados en [Planificación de lotes y creación de experimentos](#), en la [página 17](#) y los diluyen y desnaturalizan.

## Consumibles

- HP3 (2N NaOH), o si se prepara el 0.2N NaOH el mismo día: agite en vórtex y, a continuación, centrifugue brevemente.
- NB (Neutralization Buffer): agite en vórtex y, a continuación, centrifugue brevemente.
- RSB (Resuspension Buffer): agite en vórtex o invierta para mezclar.
- Tubos de microcentrífuga (1 para la preparación de reactivos y 1 para cada grupo de genotecas previsto)
- Tubo de genoteca de NovaSeq 6000Dx (n.º de referencia 20062290 o 20062291) (1 tubo para cada grupo de genotecas planificado)

## Preparación

1. Combine los volúmenes siguientes en un tubo de microcentrífuga para preparar el 0.2N NaOH. Etiquete el tubo 0.2N NaOH. Si se preparó más 0.2N NaOH durante la preparación de genotecas y el protocolo se realiza el mismo día, omita este paso.

Para evitar pequeños errores de pipeteado, se preparará un volumen mayor.

Reactivo	Volumen para cada celda de flujo S2 (µl)	Volumen para cada celda de flujo S4 (µl)
HP3	5	10
RSB	45	90

2. Agite en vórtice y, a continuación, centrifugue brevemente.

## Procedimiento

1. Si la placa FLP se almacenó congelada, prepárela como se indica a continuación. De lo contrario, vaya al paso 2.

Placa FLP:

- a. Descongele a temperatura ambiente durante 30 minutos.
  - b. Centrifugue a 1000 × g durante 1 minuto.
  - c. Retire el sello de la FLP.
  - d. Mediante el uso de una pipeta multicanal ajustada a 30 µl, pipetee la mezcla de 5 a 10 veces.
  - e. Selle y centrifugue a 1000 × g durante 1 minuto.
2. Seleccione una de las siguientes opciones para agrupar, desnaturalizar y diluir las genotecas para cada conjunto de 6 o 16 muestras planificadas para secuenciación.

**Opción 1** Genotecas de secuencia 6 en la celda de flujo S2.

- a. Para cada grupo de genotecas, etiquete un nuevo tubo de microcentrífuga con el nombre de la agrupación, por ejemplo, bibliotecas agrupadas (PL) 1, 2, 3, etc.



- b. Retire el sello y transfiera 25 µl de cada genoteca de ADN con código de barras de un determinado juego de índices S2 de la placa FLP al tubo PL para cada experimento planificado correspondiente según los grupos de secuenciación planificados durante la [Planificación de lotes y creación de experimentos, en la página 17](#). Por ejemplo, combine genotecas preparadas con el juego de índices S2 1 en el tubo PL.
- c. Aplique sello adhesivo para placas en la placa FLP y vuelva a almacenarla.
- d. Añada 37 µl de 0.2N NaOH a cada tubo PL.
- e. Agite en vórtex cada tubo PL para mezclar. Centrifugue brevemente.
- f. Incube cada tubo PL a temperatura ambiente durante 8 minutos.
- g. Añada 38 µl de NB a cada tubo PL.
- h. Agite en vórtex cada tubo PL para mezclar. Centrifugue brevemente.
- i. Transfiera 225 µl de genoteca diluida y desnaturalizada a un tubo de genoteca limpio de NovaSeq 6000Dx.



### PRECAUCIÓN

Si se ha especificado previamente, se utilizará el ID del tubo de la genoteca de NovaSeq 6000Dx para identificar y asociar el experimento planificado. Asegúrese de que el ID del tubo de la genoteca al que se transfiere la agrupación sea el mismo ID del tubo de la genoteca especificado en Create Run, de lo contrario, podría producirse una asociación incorrecta de los resultados de la muestra. Si se especifica el ID del tubo de la genoteca en el experimento planificado, confirme que se utiliza el tubo correcto. Si no se ha especificado previamente, anote el ID del tubo de la genoteca utilizado y revise el experimento planificado; de lo contrario, deberá seleccionar manualmente los experimentos planificados asociados al cargar el instrumento con el nombre del experimento.

#### Opción 1 Genotecas de secuencia 16 en la celda de flujo S4.

- a. Etiquete un nuevo tubo de microcentrífuga con el nombre de la agrupación, por ejemplo, bibliotecas agrupadas (PL) 1, 2, 3, etc.
- b. Retire el sello y transfiera 18 µl de cada genoteca de ADN de la placa FLP al tubo PL según los grupos de secuenciación planificados durante la [Planificación de lotes y creación de experimentos, en la página 17](#). Por ejemplo, combine genotecas preparadas con el juego de índices S4 1 en el tubo PL.
- c. Aplique sello adhesivo para placas en la placa FLP y vuelva a almacenarla.
- d. Añada 22 µl de RSB a cada tubo PL.
- e. Añada 77 µl de 0.2N NaOH a cada tubo PL.
- f. Agite en vórtex el tubo PL para mezclar. Centrifugue brevemente.
- g. Incube el tubo PL a temperatura ambiente durante 8 minutos.
- h. Añada 78 µl de NB al tubo PL.
- i. Agite en vórtex el tubo PL para mezclar. Centrifugue brevemente.
- j. Transfiera 465 µl de genoteca diluida y desnaturalizada a un tubo de genoteca limpio de NovaSeq 6000Dx.



## PRECAUCIÓN

Si se ha especificado previamente, se utilizará el ID del tubo de la genoteca de NovaSeq 6000Dx para identificar y asociar el experimento planificado. Asegúrese de que el ID del tubo de la genoteca al que se transfiere la agrupación sea el mismo ID del tubo de la genoteca especificado en Create Run, de lo contrario, podría producirse una asociación incorrecta de los resultados de la muestra. Si se especifica el ID del tubo de la genoteca en el experimento planificado, confirme que se utiliza el tubo correcto. Si no se ha especificado previamente, anote el ID del tubo de la genoteca utilizado y revise el experimento planificado; de lo contrario, deberá seleccionar manualmente los experimentos planificados asociados al cargar el instrumento con el nombre del experimento.

3. Proceda directamente a la secuenciación si tiene previsto iniciar el experimento el mismo día.

## PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si va a detener el proceso, tape el tubo de genotecas de NovaSeq 6000Dx y almacénelo a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C durante un periodo de 30 días como máximo.

## Preparación para la secuenciación

1. Siga las instrucciones de preparación del Documentación de NovaSeq 6000Dx Instrument (documento #200010105) para los consumibles del kit planificado para la secuenciación.
2. Si el tubo de genotecas de NovaSeq 6000Dx que contiene la genoteca agrupada se almacenó congelado, prepare de la siguiente manera. Si continúa directamente desde la sección anterior, pase a 3.
  - a. Descongele a temperatura ambiente durante 30 minutos.
  - b. Retire el tapón y pipetee suavemente la mezcla cinco veces utilizando un juego de pipetas P1000 de 300 µl para el grupo de genotecas de células de flujo S4 o un juego de pipetas P200 de 145 µl para el grupo de genotecas de células de flujo S2.
  - c. Tape el tubo de genotecas de NovaSeq 6000Dx y agite las gotas hasta el fondo a mano. No agite en vórtex ni centrifugue.
3. Carga de los consumibles. Consulte Documentación de NovaSeq 6000Dx Instrument (documento #200010105) para obtener más detalles.

## Interpretación de resultados

TruSight Whole Genome está diseñado para secuenciar el genoma humano completo. Se informa de las variantes de las muestras que superan los controles de calidad (CC) analíticos para su uso con aplicaciones de línea germinal de análisis terciario posteriores.

- Un resultado de secuenciación, FASTQ o calidad de la muestra se considera válido solo si el indicador de calidad cumple o supera la especificación definida. Si el parámetro de calidad está por debajo de la especificación definida, el rendimiento se notificará como FAIL (NO SUPERADO) y la muestra debe repetirse. Para obtener información sobre las especificaciones del indicador de calidad utilizadas para determinar la validez de la muestra, consulte [Controles de calidad, en la página 35](#).
- Se espera que las muestras que superen todos los umbrales de calidad proporcionen el rendimiento de determinación de variantes descrito en el estudio de precisión (consulte [Exactitud, en la página 46](#)).
- Las variantes pequeñas se anotan con confianza alta, intermedia o baja en función del rendimiento esperado de cada tipo de variante (consulte [Determinación del nivel de confianza de las variantes pequeñas, en la página 41](#)).
- La interpretación de toda la información de variantes debe ser validada por el laboratorio utilizando los archivos de resultados de análisis proporcionados. Consulte Guía de TruSight Whole Genome Analysis Application (n.º de documento 200049931) para obtener una descripción de la información proporcionada en los archivos de resultados.

## Controles de calidad

El ciclo de secuenciación y la validez de la muestra se determinan automáticamente mediante controles analíticos y son notificados por TruSight Whole Genome Analysis Application (consulte [Tabla 8](#) para obtener más detalles sobre las especificaciones de los indicadores de control de calidad). TruSight Whole Genome no requiere el uso de controles positivos externos.

- Los resultados del CC se notifican en un informe consolidado para todas las muestras de un experimento y en informes de CC de muestras individuales. El software envía los informes a la carpeta de análisis. Consulte en Guía de TruSight Whole Genome Analysis Application (n.º de documento 200049931) la ubicación de la carpeta de análisis y la carpeta del experimento.
- El incumplimiento de la especificación de control de calidad del experimento de secuenciación invalida el experimento de secuenciación y detiene los análisis adicionales.
- El incumplimiento de cualquier especificación de FASTQ o genoteca de muestras invalida la genoteca de muestras e impide la salida de los archivos CRAM o VCF asociados.
- Pueden aplicarse medidas adicionales para el control de calidad en virtud de la regulación local, estatal o federal, o en virtud de los requisitos de acreditación.

Para obtener más información sobre la repetición de los experimentos de secuenciación o preparación de genotecas, consulte [Solución de problemas, en la página 75](#).

Tabla 8 TruSight Whole Genome Descripciones de las especificaciones de los parámetros de control de calidad

	<b>Criterio de medición</b>	<b>Especificación</b>	<b>Descripción</b>
CC del experimento de secuenciación	% total $\geq$ Q30	$\geq$ 85	Medición de la calidad de la base a nivel de experimento. La especificación mínima se establece porque los experimentos con un porcentaje Q30 demasiado bajo no superarán las bases Q30 en el control de calidad de la genoteca de muestras.
CC de FASTQ	Rendimiento por muestra (bps)	$\geq$ 90 000 000 000	El mínimo se establece para que sea equivalente a aproximadamente 26 veces la cobertura autosómica media, con el fin de seleccionar las muestras que no pasarán el control de calidad de la genoteca y reducir así el tiempo de análisis.

	<b>Criterio de medición</b>	<b>Especificación</b>	<b>Descripción</b>
CC de genoteca de muestras	Cobertura autosómica media	$\geq 35$	Cobertura media en los autosomas. La especificación mínima se establece para garantizar el rendimiento analítico.
	Porcentaje de autosomas con una cobertura mayor de 20X	$\geq 93,94$	Medida de uniformidad de cobertura que detecta problemas no necesariamente relacionados con el sesgo de GC. La especificación mínima se establece para garantizar el rendimiento analítico.
	Cobertura normalizada entre el 60 % y el 79 % de los grupos de GC	$0,82 \leq x \leq 1,13$	Medida de uniformidad de cobertura que detecta sesgo de GC, específicamente una pérdida de cobertura en áreas del genoma con mayor porcentaje de GC y menor porcentaje de composición base de AT. Las especificaciones mínimas y máximas se establecen para garantizar el rendimiento analítico.
	Cobertura normalizada entre el 20 % y el 39 % de los grupos de GC	$0,97 \leq x \leq 1,06$	Medida de uniformidad de cobertura que detecta sesgo de GC, específicamente una pérdida de cobertura en áreas del genoma con menor porcentaje de GC y mayor porcentaje de composición base de AT. Las especificaciones mínimas y máximas se establecen para garantizar el rendimiento analítico.
	Cobertura mitocondrial media	$\geq 500$	Cobertura del cromosoma mitocondrial. La especificación mínima se establece para garantizar el límite de detección de SNV mitocondrial.
	Porcentaje de bases Q30	$\geq 85$	Medida de la calidad base. La especificación mínima se establece para garantizar el rendimiento analítico.
	Contaminación estimada de la muestra	$\leq 0,005$	Detecta lecturas contaminantes de otras muestras. La especificación máxima se establece para garantizar el límite de detección de SNV mitocondriales (el tipo de variante con mayor sensibilidad a la contaminación).

## Características de rendimiento

Los siguientes estudios de validación se realizaron utilizando el flujo de trabajo de TruSight Whole Genome descrito en las [Instrucciones de uso, en la página 17](#) y se diseñaron para garantizar la solidez del ensayo frente a fuentes de variación comunes y para proporcionar recomendaciones para un rendimiento uniforme. Estos estudios utilizaron las especificaciones métricas de control de calidad analítico descritas en [Tabla 8](#) como referencia para el rendimiento satisfactorio del ensayo y como requisito previo para establecer el rendimiento de la llamada de variantes analíticas.

## Contaminación cruzada

El estudio de contaminación cruzada evaluó la detección incorrecta de la lectura del índice debido a la contaminación de pocillo a pocillo durante la preparación de la genoteca de muestras y la contaminación de experimento a experimento entre experimentos de secuenciación consecutivos. Se utilizaron 24 muestras de sangre para evaluar la contaminación cruzada. Dos operadores prepararon 24 genotecas en total utilizando los conjuntos de configuración de índices S2 1–4, y los grupos de genotecas se secuenciaron en el orden de índice establecido en NovaSeq 6000Dx Instrument. Dos operadores prepararon 16 genotecas utilizando los conjuntos de configuración de índices S4 1 y 2 en dos réplicas, y las genotecas agrupadas con conjuntos de índices alternos se secuenciaron en el mismo NovaSeq 6000Dx.

Para evaluar la contaminación cruzada, se compararon las lecturas del índice correctas con las lecturas del índice de los pocillos adyacentes para la contaminación de pocillo a pocillo y la secuenciación anterior para la contaminación de experimento a experimento. La cantidad de contaminación entre experimentos fue  $\leq 0,003178\%$  en S2 y  $\leq 0,002487\%$  en S4. Para evaluar la contaminación de muestra a muestra, se utilizó el parámetro de CC de la genoteca de muestras para la contaminación estimada de la muestra. La cantidad de contaminación de muestra a muestra fue de 0,001, el valor más bajo notificado por el software de análisis. Estos resultados indican que existe un bajo riesgo de contaminación dentro de los flujos de trabajo de preparación y secuenciación de genotecas.

## Estabilidad en uso e intermedia

Se evaluó la estabilidad de los reactivos de preparación de genotecas durante el uso del kit, incluidos múltiples eventos de congelación y descongelación y estabilidad de tubos abiertos.

Para las pruebas de los ciclos de congelación y descongelación, los componentes congelados se sometieron a cinco eventos de congelación y descongelación para soportar un evento de desembalaje y cuatro eventos de uso del kit. Para la estabilidad durante el uso, se retiró el volumen necesario para preparar seis genotecas de muestras en cada uno de los tres ciclos de congelación y descongelación para simular el agotamiento del volumen durante el uso, y los componentes se almacenaron durante 31 días adicionales antes de la prueba. Tras analizar el ADNg extraído de seis donantes de sangre, todos los datos superaron los parámetros de control analítico del ensayo. Estos resultados indican que los reactivos de preparación de genotecas congeladas pueden utilizarse con hasta cuatro ciclos de congelación y descongelación y 30 días de estabilidad en uso.

Se evaluó la estabilidad intermedia de las genotecas individuales y las genotecas agrupadas y desnaturalizadas. Todos los datos superaron los parámetros de control analítico del ensayo, lo que indica una estabilidad de hasta 14 días para las genotecas individuales y una estabilidad de hasta 30 días para las genotecas agrupadas y desnaturalizadas cuando se almacenan congeladas (de -25 °C a -15 °C) como se describe en los puntos de detención de seguridad.

## Recogida y conservación de muestras de sangre

La compatibilidad de los tubos de recogida de sangre y el almacenamiento de las muestras se examinaron utilizando cuatro donantes y la sangre extraída en tubos de recogida EDTA de tres proveedores diferentes. El ADN genómico (ADNg) se extrajo de cada uno a su llegada para el tiempo cero y luego nuevamente después de que la sangre se mantuvo durante 16, 33 y 43 días de almacenamiento a 2 °C a 8 °C. El ADNg extraído se almacenó congelado (de -25 °C a -15 °C) en el tampón de elución (10 mM de Tris-Cl, 0,5 mM de EDTA, pH 9,0) y luego se cuantificó y se usó para la preparación y secuenciación de genotecas. Todos los datos superaron los parámetros de control analítico del ensayo, lo que indica la compatibilidad del ensayo con tres tubos diferentes de recogida de sangre con EDTA y con sangre almacenada hasta cinco semanas entre 2 °C y 8 °C.

## Evaluación del método de extracción de ADN

Se evaluó el rendimiento del ensayo en tres kits de extracción disponibles en el mercado. Dos kits utilizaron bolas magnéticas, uno con y otro sin fase sólida y unión basada en celulosa, y un kit utilizó un método de purificación de ácidos nucleicos basado en membrana de sílice mediante columnas de centrifugación ([Tabla 9](#)).

La evaluación la realizaron dos operadores con un lote de reactivos de extracción por método y sangre completa recogida en tubos EDTA de cuatro donantes supuestamente sanos. Cada muestra de sangre se extrajo cuatro veces por separado de acuerdo con las instrucciones del fabricante en días no consecutivos durante un total de 16 observaciones por kit. El ADNg extraído se utilizó para preparar genotecas para secuenciación y análisis.

Todas las observaciones (16/16) de cada método de extracción superaron los parámetros de control analítico del ensayo. El rendimiento del ensayo no se vio afectado por la elección del método de extracción de ADNg de la muestra. Los estudios de precisión analítica y reproducibilidad utilizaron ADNg extraído con el kit 3 (aislamiento en columna de filtro de sílice con columnas de centrifugado).

Tabla 9 Métodos de extracción de rendimiento probado en TruSight Whole Genome

Kit	Método de extracción
1	Extracción magnética de bolas con inmovilización reversible de fase sólida (SPRI)
2	Extracción de bolas magnéticas con fase sólida móvil y unión basada en celulosa
3	Aislamiento en columna de filtro de sílice con columnas de centrifugado

## Sensibilidad de entrada de ADN

La cantidad de entrada de ADN recomendada para el análisis por muestra es de 280 ng o 350 ng en función de los métodos de cuantificación de ADN enumerados en [Recomendaciones de entrada de ADN, en la página 11](#).

Para determinar el rendimiento en un intervalo de concentraciones de entrada de ADN, la cantidad de ADN utilizada en el ensayo se analizó a niveles que oscilaban  $\pm 28,6$  % de la entrada recomendada. Los resultados demostraron que el -25 % de la entrada recomendada de ADN es un límite inferior para el ensayo. El ensayo funciona adecuadamente con la entrada de ADN hasta +28,6 % de la entrada recomendada.

La caracterización de tres métodos de cuantificación distintos demostró que los diferentes métodos tienen diferentes niveles de variabilidad y pueden producir resultados diferentes. Si se utiliza un método distinto de los enumerados en [Recomendaciones de entrada de ADN, en la página 11](#), es posible que sea necesario optimizar la entrada de ADN diana. Se recomienda que el ADN de las muestras destinadas a un lote concreto de preparación de genotecas y a un experimento de secuenciación se cuantifique conjuntamente para eliminar la variabilidad entre lotes cuando sea posible, o que se utilicen controles del proceso para garantizar una variabilidad entre lotes de la cuantificación del ADN  $\leq 25$  %.

## Sustancias interferentes

En este estudio se evaluó el rendimiento de sustancias endógenas y exógenas asociadas con sangre humana y tubos de recogida de sangre. Se seleccionaron bilirrubina, hemoglobina y triglicéridos para su evaluación para simular muestras ictericas, hemolizadas y lipémicas, respectivamente. La biotina y el EDTA se seleccionaron para su evaluación debido a su presencia en la sangre y en los tubos de recogida de sangre (BCT), y por su impacto potencial en la química del ensayo. Las sustancias se añadieron a las muestras de sangre del donante antes de la extracción, ya sea directamente o después de la disolución en disolvente. La concentración de prueba y los detalles de la adición para cada sustancia se proporcionan en la siguiente tabla.

Tabla 10 Sustancias interferentes probadas para el rendimiento de TruSight Whole Genome

Sustancia	Concentración de prueba	Disolvente utilizado en solución para adicionar	% de adición añadida a la sangre
Bilirrubina (sin conjugar)	40 mg/dl (0,4 mg/ml) <sup>1</sup>	DMSO	4 %
Hemoglobina	1000 mg/dl (10 mg/ml) <sup>1</sup>	N/A: disuelto en sangre	N/A: disuelto en sangre
Triglicéridos	1500 mg/dl (15 mg/ml) <sup>1</sup>	Etanol al 100 %	4 %
Biotina	0,00351 mg/ml <sup>2</sup>	Agua	4 %
EDTA	5,4 mg/ml <sup>3</sup>	Agua	3 %

<sup>1</sup> Se eligieron las concentraciones más altas observadas según las "Tablas suplementarias para pruebas de interferencia en química clínica, CLSI EP37-ED1:2018".



<sup>2</sup> La concentración se eligió para ser tres veces la “mayor concentración del fármaco bajo tratamiento terapéutico” indicada en “Tablas complementarias para pruebas de interferencia en química clínica, CLSI EP37-ED1:2018”.

<sup>3</sup> La concentración se eligió en función de la concentración de EDTA, que varía en los tubos de recogida de sangre hasta 1,8 mg/ml y para simular un acontecimiento de llenado corto, se extrajo una muestra de sangre del 33 % del volumen nominal de BCT, lo que dio lugar a una concentración de EDTA 3 veces mayor en la sangre correspondiente a 5,4 mg/ml.

En el análisis se utilizó sangre de cuatro donantes. Para cada sustancia interferente, se añadió el interferente a una alícuota de sangre completa de cada donante y luego se dividió entre cuatro réplicas de extracción de ADNg. Un control se procesó de forma similar sin añadir sustancias. Las condiciones de prueba y control emparejadas se procesaron para cada donante dentro del mismo evento de extracción, y el ADNg extraído se procesó después dentro de un único evento de preparación y secuenciación de genotecas. No hubo ningún efecto en el rendimiento del ensayo ni evidencia de interferencia en respuesta a ninguna de las sustancias analizadas.

## Equivalencia de indexación de muestras

TruSight Whole Genome proporciona una opción de cuatro juegos de índices de 6 unidades de plexado para experimentos S2 o dos juegos de índices de 16 unidades de plexado para configuraciones de experimentos de secuenciación S4. Se ha demostrado que el ensayo proporciona un rendimiento equivalente cuando las genotecas se secuencian en las configuraciones de experimentos de secuenciación S2 o S4 de NovaSeq 6000Dx. Además, tanto la configuración de experimento S2 como la S4 demostraron alcanzar >95 % de las genotecas de muestras con una cobertura mínima de 35,0x cuando se probaron con los juegos de índices prescritos. Así, los diferentes juegos de índices y agrupaciones utilizados para secuenciar en las celdas de flujo S2 y S4 pueden utilizarse indistintamente para ofrecer una capacidad de ampliación que se adapte a las fluctuaciones en el rendimiento de las muestras y proporcione flexibilidad en los procesos de laboratorio.

## Rendimiento analítico

Se realizaron estudios de caracterización inicial para determinar los umbrales de nivel de confianza para variantes pequeñas, el límite del blanco/límite de detección para SNV mitocondriales y los umbrales de tamaño para la detección precisa de STR expandidas cuando se utilizaba el flujo de trabajo de TruSight Whole Genome. Las muestras que representan las clases de variantes evaluadas por TruSight Whole Genome se incluyeron en la evaluación de la precisión analítica y la repetibilidad, incluidas la precisión dentro del laboratorio y la reproducibilidad externa. Se informa del rendimiento analítico de los experimentos de secuenciación y de las muestras que superaron todos los controles de calidad, excepto en el caso de las muestras de mezcla artificial utilizadas para evaluar las SNV mitocondriales en el límite de detección o cerca del mismo, que no superaron el parámetro de contaminación. Los resultados de cada uno de estos estudios se describen en las secciones siguientes.

### Estudios de caracterización inicial

#### Determinación del nivel de confianza de las variantes pequeñas

Para este estudio, se entrenó un modelo de regresión logística en centros de variantes altamente reproducibles y poco reproducibles de 96 réplicas de NA12878 para definir los umbrales de los niveles de confianza alto, medio y bajo.

Las bases de confianza alta de un tipo de variante dado son aquellas en las que la reproducibilidad prevista dentro del laboratorio cumple o supera el 99 % en un umbral de puntuación dado y el porcentaje de bases no N que satisfacen ese criterio supera el 30 %. Si un tipo de variante pequeña no tiene un umbral de puntuación que cumpla estos criterios, ese tipo de variante no tendrá un nivel de confianza alto. Las bases de confianza intermedia son aquellas en las que la reproducibilidad prevista dentro del laboratorio alcanza o supera el 95 % en un umbral de puntuación y tipo de variante dados. Las bases de confianza baja son aquellas en las que la reproducibilidad prevista dentro del laboratorio es inferior al 95 % en un umbral de puntuación y un tipo de variante dados. Las llamadas de variantes de un tipo de variante concreto con un nivel de confianza alto o intermedio incluyen la mayoría de las bases no N (es decir, excluyendo los huecos) (consulte la Tabla 6) y demuestran un alto rendimiento cuando se evalúan frente a conjuntos de verdad de variantes pequeñas y en evaluaciones exhaustivas de la precisión dentro del laboratorio de las réplicas NA12878.

Tipo de variante	Nivel de confianza	% de bases no N
SNV	Alto	89,14 %
	Intermedio	3,30 %
	Bajo	7,56 %
Deleciones cortas (1–5 pb)	Alto	90,88 %
	Intermedio	2,45 %
	Bajo	6,67 %
Deleciones intermedias (6–15 pb)	Intermedio	86,94 %
	Bajo	13,06 %
Deleciones largas ( $\geq 16$ pb)	Intermedio	85,42 %
	Bajo	14,58 %
Inserciones cortas (1–5 pb)	Alto	88,94 %
	Intermedio	4,61 %
	Bajo	6,45 %
Inserciones intermedias (6–15 pb)	Intermedio	89,37 %
	Bajo	10,63 %
Inserciones largas ( $\geq 16$ pb)	Intermedio	48,92 %
	Bajo	50,63 %

### Determinación de límite del blanco/límite de detección de SNV mitocondriales

Se realizaron estudios de límite del blanco (LoB) y límite de detección (LoD) para SNV mitocondriales. Para el estudio de SNV mitocondrial, el LoB se evaluó utilizando locus que se sabe que no tienen variante (es decir, llamada de referencia). El LoD se define como la frecuencia alélica de la variante SNV del ADNmt para la que la tasa de detección de esa variante es del 95 %.

Para determinar el LoB y el LoD para la detección de SNVmt heteroplasmáticas, se mezclaron muestras de ADNg bien caracterizadas de dos donantes de sangre diferentes en un estudio de valoración a cinco niveles de dilución con 20 réplicas por nivel de dilución. Los niveles de dilución se diseñaron en función de los porcentajes de variantes de mtSNV (VAF 1,2–6 %) para imitar varios niveles de heteroplasma mitocondrial. Se procesaron muestras de ADNg mezcladas y se redujeron las lecturas para lograr una cobertura mitocondrial media de 500x. Se utilizó un total de 42 sitios “heteroplasmáticos” artificiales en la evaluación posterior. Se utilizó un análisis de regresión para estimar las proporciones de mezcla necesarias para alcanzar un LoD 1x y un LoD 2x para un subconjunto de SNVmt.

Las posiciones en las que el ADNg de ambas muestras de sangre tienen genotipos de alelos de referencia se evaluaron para las llamadas de mtSNV que pasaron el filtro con un alelo no de referencia. La tasa de falsos positivos se calculó como el 0,8 %, coherente con una suposición de LoB cero de acuerdo con la “Evaluación de la capacidad de detección para procedimientos de medición en laboratorios clínicos, CLSI EP17-A2-ED1:2012”. Cada una de las 42 posiciones se analizó de forma independiente mediante regresión probit. El valor del LoD se definió como el valor de VAF esperado correspondiente a la tasa de detección del 95 % (C95). El valor global del LoD notificado, definido como el percentil 95 de los valores del LoD de los centros de verdad, fue del 4,75 % de la VAF. Se calculó que la media de la distribución de las diferencias absolutas entre la VAF observada y la esperada en todas las observaciones era del 0,83 %, con un límite superior de confianza del 95 % de la FAV del 0,86 %.

## Determinación del umbral de STR expandidas

Debido a las limitaciones técnicas de las STR que superan la longitud de lectura de secuenciación (aproximadamente 135 pb), la longitud de STR observada con TruSight Whole Genome a menudo será una subestimación de la longitud real. Una vez que la longitud real de STR supera la longitud mediana del fragmento (aproximadamente 330 pb), la longitud de STR se estabiliza. Por este motivo, TruSight Whole Genome evalúa un conjunto dirigido de locus para los que el ensayo puede discriminar con precisión las STR con longitudes observadas dentro de la variación normal de aquellas con longitudes mayores que las observadas en una población supuestamente sana (“expandida”) (consulte la [Tabla 2](#) para ver la lista de locus evaluados por TruSight Whole Genome).

Para garantizar una concordancia porcentual negativa (NPA) agregada del 95 % en todos los centros de STR evaluada por TruSight Whole Genome, se establecieron umbrales por locus para llamar a una STR expandida en ese centro y lograr un promedio de NPA del 99,94 % por centro. Para tener en cuenta la variabilidad inherente en las estimaciones de tamaño de STR dentro de una población supuestamente sana, se establecieron umbrales basados en la distribución de longitudes de STR observadas independientemente en el conjunto de datos supuestamente sanos del proyecto 1000 Genomes (2504 muestras de diversas poblaciones procesadas con DRAGEN 3.7.5 y ExpansionHunter 4.0.2).<sup>4</sup>

Para confirmar los umbrales establecidos con el conjunto de datos del proyecto 1000 Genomes, se procesó ADN<sub>g</sub> extraído de 16 muestras de líneas celulares de referencia (Center for Disease Control's Genetic Testing Reference Material [Get-RM] Programs) con una variedad de tamaños de STR estimados independientemente con TruSight Whole Genome. Se prepararon y analizaron 10 réplicas de genotecas para cada una de las 16 muestras por seis operadores para un total de 960 observaciones, y los tamaños de STR se calcularon independientemente para cada réplica. La tasa observada de falsos positivos en el nivel de la muestra en todos los locus diana fue del 0,35 %.

El límite de detección (LoD) se estimó para los 28 locus de STR diana con las líneas celulares analizadas en función de los tamaños de alelos observados con TruSight Whole Genome y los tamaños de alelos esperados en función de la caracterización independiente previa (Tabla 11). Para algunos locus escogidos, se determinó un límite de detección para más de una STR en el mismo centro hasta un total de 35 STR. El LoD es el tamaño estimado en el que se detectan las STR expandidas esperadas en el 95 % de los alelos basándose en un modelo probit con los umbrales confirmados para distinguir los tamaños de STR normales y expandidas. Los datos de todos los centros con tamaños alélicos conocidos se juntaron para obtener estimaciones de LoD para cada centro basadas en el umbral específico del centro para una STR expandida. La longitud de repetición de FMR1 se subestimó sistemáticamente en comparación con otras STR y requirió un modelo personalizado para estimar adecuadamente el LoD.

Los umbrales confirmados específicos del centro para las STR expandidas, el LoD esperado y observado estimado para los centros diana y el umbral de la enfermedad basado en la bibliografía disponible (solo con fines ilustrativos) de los centros de STR diana se proporcionan en la Tabla 11. Para las STR expandidas más largas que el umbral dictado por la longitud de lectura y para las que no se puede observar directamente la longitud esperada, una longitud observada se aproxima a una longitud media que se observaría a lo largo de varios experimentos de secuenciación. Para las STR expandidas más cortas que el umbral dictado por la longitud de lectura, las longitudes esperada y observada son las mismas.

Tabla 11 Resumen de la capacidad de detección estimada para los centros de STR diana en TruSight Whole Genome

Locus diana <sup>a</sup>	Umbral de STR ampliado (pb) basado en el conjunto de datos del proyecto 1000 Genomes	LoD estimado (longitud esperada, pb)	LoD estimado (longitud observada, pb)	Umbral de la enfermedad (longitud real, pb) <sup>b</sup>
AFF2	168	266	221	600 <sup>5</sup>
AR	114	115	115	114 <sup>6</sup>
ATN1	90	92	92	135 <sup>7,8</sup>
ATXN1	114	115	115	114 <sup>7,8</sup>
ATXN10	200	298	233	3995 <sup>7,8</sup>
ATXN2	102	102	102	105 <sup>7,8</sup>
ATXN3	135	189	182	180 <sup>7,8</sup>

Locus diana <sup>a</sup>	Umbral de STR ampliado (pb) basado en el conjunto de datos del proyecto 1000 Genomes	LoD estimado (longitud esperada, pb)	LoD estimado (longitud observada, pb)	Umbral de la enfermedad (longitud real, pb) <sup>b</sup>
ATXN7	60	60	60	111 <sup>7,8</sup>
ATXN7_CCG	93	101	101	N/A
ATXN8OS	200	298	233	237 <sup>7,8</sup>
ATXN8OS_CTA	90	92	92	N/A
C9ORF72 <sup>c</sup>	200	298	233	360 <sup>9,10</sup>
CACNA1A	57	57	57	60 <sup>7,8</sup>
CBL	171	281	227	243 <sup>5</sup>
CNBP	192	308	237	300 <sup>5,11</sup>
CNBP_CA	102	102	102	N/A
CNBP_CAGA	68	80	80	N/A
CSTB	200	298	233	348 <sup>12,13</sup>
DIP2B	200	298	233	N/A
DMPK	122	132	142	150 <sup>14</sup>
FMR1	175	433	212	600 <sup>d,15</sup>
FXN	102	102	102	198 <sup>6,16</sup>
FXN_A	200	298	233	N/A
GLS	111	115	115	270 <sup>17</sup>
HTT	108	115	115	120 <sup>18</sup>
HTT_CCG	42	42	42	N/A
JPH3	99	101	101	123 <sup>19</sup>
NIPA1	33	33	33	N/A
NOP56	84	84	84	3900 <sup>20,21</sup>
NOP56_CGCCTG	24	24	24	N/A
NOTCH2NL	129	175	174	213 <sup>22,23</sup>
PABPN1	27	27	27	N/A
PHOX2B	60	60	60	75 <sup>5,24</sup>
PPP2R2B	87	90	90	198 <sup>7,8</sup>
TBP	129	175	174	135 <sup>7,8</sup>

<sup>a</sup> Los locus con STR alternativas se anotan mediante LOCI\_<ALTERNATE\_REPEAT> (p. ej., ATXN7\_GCC).

<sup>b</sup> Los umbrales de enfermedad se proporcionan solo con fines ilustrativos basados en la literatura publicada; N/A (No Aplicable) en esta columna indica que la STR puede no estar asociada con una expansión patógena publicada.

<sup>c</sup> El 100 % de las réplicas de NA23378 detectaron una STR expandida en C9ORF72, lo que sugiere una expansión no caracterizada previamente en ese centro en esa muestra. Esta muestra de línea celular se excluyó del análisis.

<sup>d</sup> Las expansiones intermedias también pueden asociarse a un fenotipo.

Este estudio demostró perfiles de precisión y exactitud similares para las estimaciones de tamaño de STR en diferentes locus diana, con el límite de detección para las STR expandidas impulsado en gran medida por el umbral seleccionado (basado en la distribución del tamaño en la población del proyecto 1000 Genomes) en lugar de por las diferencias en la capacidad de detección entre los centros. Todos los valores de LoD estimados en la escala de longitud esperada fueron mayores que las longitudes observadas en poblaciones supuestamente sanas y menores que muchos umbrales de enfermedad publicados, lo que hace que los umbrales asociados de llamada de STR expandidas sean útiles para marcar la repetición en un locus particular como potencialmente expandida. Los umbrales notificados aquí se utilizaron para evaluar la exactitud de la detección STR expandidas.

## Exactitud

La exactitud analítica se determinó comparando las llamadas de variantes de TruSight Whole Genome con los resultados obtenidos mediante métodos alternativos. Los métodos de referencia se eligieron en función de una diferencia considerable en comparación con TruSight Whole Genome, que utiliza una preparación de genotecas vinculada por bolas Nextera™, química de secuenciación de 2 colorantes en NovaSeq 6000Dx, y DRAGEN 3.9.5 para la determinación de variantes. Se realizó un enfoque representativo de la validación de TruSight Whole Genome con muestras que representaban variantes de todas las clases de variantes incluidas en el resultado del ensayo. Se utilizó un total de 459 muestras únicas que superaron el control de calidad analítico para evaluar la precisión de TruSight Whole Genome. Las muestras se analizaron en tres lotes de reactivos y consumibles para la preparación de genotecas, cuatro lotes de kits de secuenciación S4, ocho operadores, cinco NovaSeq 6000Dx Instrument y dos centros internos. Se prepararon y secuenciaron 31 grupos de genotecas independientes.

La tabla siguiente proporciona las definiciones de los parámetros de medición calculados en estudios de exactitud.

Término	Definición
Nivel de confianza inferior (LCL)	Límite de confianza inferior unilateral del 95 % utilizando el método de Wilson.
Concordancia porcentual negativa (NPA) <sup>1</sup>	Porcentaje de sitios negativos definidos por el método de referencia que se identifican de forma concordante como negativos con TruSight Whole Genome.
Concordancia porcentual positiva (PPA) <sup>2</sup>	Porcentaje de variantes llamadas en el método de referencia que se llaman de forma concordante con TruSight Whole Genome.

Término	Definición
Valor predictivo técnico positivo (TPPV) <sup>3</sup>	Porcentaje de variantes llamadas con TruSight Whole Genome que se llaman de forma concordante en el método de referencia.

<sup>1</sup> Para la precisión de la detección de las STR expandidas y la precisión de la detección de alelos SMN1, NPA = negativo verdadero / (negativo verdadero + falso positivo).

<sup>2</sup> Para la precisión de la detección de las STR expandidas y la precisión de la detección de alelos SMN1, PPA = positivo verdadero / (positivo verdadero + falso negativo).

<sup>3</sup> Para la precisión de la detección de las STR expandidas y la precisión de la detección de alelos SMN1, TPPV = positivo verdadero / (positivo verdadero + falso positivo).

## Precisión de variantes pequeñas

La precisión de las llamadas de variantes pequeñas se evaluó utilizando ADN genómico extraído de sangre completa periférica de 195 donantes supuestamente sanos. Las llamadas de variantes de TruSight Whole Genome se compararon con las llamadas de variantes de una prueba de secuenciación del genoma completo validada clínicamente y realizada en el laboratorio CLIA de Servicios de Laboratorio (ILS) de Illumina como método de referencia. El flujo de trabajo de secuenciación del genoma completo del método de referencia utiliza una preparación de genotecas TruSeq™ sin PCR basada en ligadura, química de secuenciación de 4 colorantes en el sistema de secuenciación HiSeq™ y DRAGEN 3.8.4 para la llamada de variantes. En este estudio no se caracterizaron inserciones y deleciones >31 pb de tamaño porque no se validaron en el método de referencia.

En la [Tabla 12](#) y la [Tabla 13](#) se muestra un resumen de la precisión de todas las llamadas de variantes pequeñas.

Tabla 12 Ensayo TruSight Whole Genome Precisión de las variantes pequeñas estratificadas por tamaño y nivel de confianza (muestras de sangre supuestamente sanas)

Subtipo de variante	Nivel de confianza	Llamadas concordantes del método de referencia	Llamadas exclusivas del método de referencia	Llamadas concordantes del ensayo	Llamadas exclusivas del ensayo	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV	Alto	261,728,580	1,573,877	261,603,149	208,639	99,4 % (99,4 %)	99,9 % (99,9 %)
	Intermedio	6,677,589	421,718	6,519,811	151,128	94,1 % (94,0 %)	97,7 % (97,7 %)
	Bajo	6,864,840	3,251,709	6,649,756	2,151,388	67,9 % (67,8 %)	75,6 % (75,5 %)

Subtipo de variante	Nivel de confianza	Llamadas concordantes del método de referencia	Llamadas exclusivas del método de referencia	Llamadas concordantes del ensayo	Llamadas exclusivas del ensayo	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
<b>Delección corta (1-5 pb)</b>	Alto	11,978,745	201,783	12,246,922	67,277	98,3 % (98,3 %)	99,5 % (99,5 %)
	Intermedio	2,875,258	45,290	3,050,170	47,593	98,4 % (98,4 %)	98,5 % (98,5 %)
	Bajo	1,802,544	228,582	1,966,974	221,449	88,7 % (88,7 %)	89,9 % (89,8 %)
<b>Delección media (6-15 pb)</b>	Intermedio	858,673	20,079	860,493	18,361	97,7 % (97,7 %)	97,9 % (97,9 %)
	Bajo	145,618	28,300	157,398	41,824	83,7 % (83,6 %)	79,0 % (78,9 %)
<b>Delección larga (16-31 pb)</b>	Intermedio	344,168	14,334	336,976	31,165	96,0 % (95,9 %)	91,5 % (91,5 %)
	Bajo	54,444	23,438	53,835	47,272	69,9 % (69,6 %)	53,2 % (53,0 %)
<b>Inserción corta (1-5 bp)</b>	Alto	11,212,366	164,651	11,380,307	49,776	98,6 % (98,5 %)	99,6 % (99,6 %)
	Intermedio	1,015,324	41,890	988,512	36,051	96,0 % (96,0 %)	96,5 % (96,5 %)
	Bajo	639,663	198,700	576,797	180,458	76,3 % (76,2 %)	76,2 % (76,1 %)
<b>Inserción media (6-15 pb)</b>	Intermedio	790,968	18,163	798,572	17,111	97,8 % (97,7 %)	97,9 % (97,9 %)
	Bajo	76,105	24,188	88,389	35,819	75,9 % (75,7 %)	71,2 % (71,0 %)
<b>Inserción larga (16-31 pb)</b>	Intermedio	159,927	3,135	159,432	8,639	98,1 % (98,0 %)	94,9 % (94,8 %)
	Bajo	102,552	22,199	103,892	55,724	82,2 % (82,0 %)	65,1 % (64,9 %)



Tabla 13 Resumen de NPA de llamadas de variantes pequeñas estratificadas por nivel de confianza de TruSight Whole Genome

Nivel de confianza	Llamadas negativas concordantes	Método de referencia Llamadas negativas exclusivas	NPA (LCL)
Alto	202,276,243,790	127,465,816	99,9 % (99,9 %)
Intermedio	3,307,740,675	77,650,177	97,7 % (97,7 %)
Bajo	3,653,569,580	439,038,662	89,3 % (89,3 %)

Se realizó un estudio complementario de exactitud para evaluar la detección de variantes pequeñas con muestras de ADN de líneas celulares de referencia disponibles en el mercado (Coriell Institute for Medical Research) con conjuntos de llamadas bien caracterizados generados por el Consorcio Genome in a Bottle (GIAB). Para este estudio, se utilizaron los conjuntos de llamadas GIAB como método de referencia. La verdad establecida en estas muestras incluye inserciones y deleciones superiores a 31 pb, por lo que se incluyeron inserciones y deleciones más grandes en esta evaluación. Estas muestras incluyeron HG001-005 y NA24695 con los resultados mostrados en conjunto en la [Tabla 14](#).

Tabla 14 Ensayo TruSight Whole Genome Precisión de las variantes pequeñas estratificadas por tamaño y nivel de confianza (muestras de líneas celulares bien caracterizadas)

Subtipo de variante	Nivel de confianza	Llamadas concordantes de GIAB	Llamadas exclusivas de GIAB	Llamadas concordantes del ensayo	Llamadas exclusivas del ensayo	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV	Alto	21,431,369	2,552	21,439,303	3,954	>99,9 % (>99,9 %)	>99,9 % (>99,9 %)
	Intermedio	908,172	1,259	910,058	2,175	99,9 % (99,9 %)	99,8 % (99,8 %)
	Bajo	720,717	59,691	722,180	28,721	92,4 % (92,3 %)	96,2 % (96,1 %)
Delección corta (1-5 pb)	Alto	1,080,383	690	1,090,370	730	99,9 % (99,9 %)	99,9 % (99,9 %)
	Intermedio	423,547	788	437,019	606	99,8 % (99,8 %)	99,9 % (99,9 %)
	Bajo	263,828	2,624	281,217	2,088	99,0 % (99,0 %)	99,3 % (99,2 %)

Subtipo de variante	Nivel de confianza	Llamadas concordantes de GIAB	Llamadas exclusivas de GIAB	Llamadas concordantes del ensayo	Llamadas exclusivas del ensayo	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Delección media (6-15 pb)	Intermedio	142,671	238	144,997	167	99,8 % (99,8 %)	99,9 % (99,9 %)
	Bajo	86,174	812	91,710	546	99,1 % (99,0 %)	99,4 % (99,4 %)
Delección larga ( $\geq 16$ pb)	Intermedio	34,414	315	34,580	55	99,1 % (99,0 %)	99,8 % (99,8 %)
	Bajo	9,985	393	10,212	106	96,2 % (95,9 %)	99,0 % (98,8 %)
Inserción corta (1-5 bp)	Alto	927,288	221	925,787	271	>99,9 % (>99,9 %)	>99,9 % (>99,9 %)
	Intermedio	158,346	294	137,081	250	99,8 % (99,8 %)	99,8 % (99,8 %)
	Bajo	93,857	2,402	75,687	1,427	97,5 % (97,4 %)	98,1 % (98,1 %)
Inserción media (6-15 pb)	Intermedio	91,117	116	89,054	60	99,9 % (99,9 %)	99,9 % (99,9 %)
	Bajo	37,925	745	36,670	406	98,1 % (98,0 %)	98,9 % (98,8 %)
Inserción larga ( $\geq 16$ pb)	Intermedio	11,081	46	11,110	17	99,6 % (99,5 %)	99,8 % (99,8 %)
	Bajo	14,086	607	14,312	262	95,9 % (95,6 %)	98,2 % (98,0 %)

## Precisión de las variantes en el número de copias

La precisión de la llamada de CNV se evaluó utilizando el mismo método de referencia y muestras de donantes de sangre supuestamente sanos (195) que se utilizaron para evaluar la precisión de la llamada de variantes pequeñas. Cada CNV se considera detectada en el conjunto de llamadas si al menos el 50 % de esa CNV está cubierta por la unión de llamadas CNV del mismo tipo (GANANCIA/PÉRDIDA) en el conjunto de llamadas emparejadas. TruSight Whole Genome define un conjunto de regiones genómicas que se excluyen de las llamadas CNV basándose en una evaluación de los datos de muestra de 1000 genomas y 77 donantes de sangre supuestamente sanos utilizando parámetros relacionados con valores atípicos de profundidad de cobertura, valores atípicos de varianza de cobertura y huecos en la cobertura para determinar regiones del genoma que no son notificables para CNV. Las llamadas de CNV solo se evaluaron sobre regiones genómicas que eran frecuentes tanto para el método de referencia como para TruSight Whole Genome. En la [Tabla 15](#) y la [Tabla 16](#) se muestra un resumen de la precisión de todas las llamadas de CNV.

Tabla 15 Ensayo TruSight Whole Genome Precisión de las CNV estratificadas por tamaño y tipo

Tamaño	Tipo	Llamadas concordantes del método de referencia	Llamadas exclusivas del método de referencia	Llamadas concordantes del ensayo	Llamadas exclusivas del ensayo	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
10-25 kpb	GANANCIA	443	98	342	56	81,89 % (79,01 %)	85,93 % (82,82 %)
	PÉRDIDA	4,162	457	4,155	679	90,11 % (89,36 %)	85,95 % (85,11 %)
25-50 kpb	GANANCIA	355	117	370	76	75,21 % (71,81 %)	82,96 % (79,83 %)
	PÉRDIDA	1,587	16	1,622	7	99,00 % (98,50 %)	99,57 % (99,21 %)
50-100 kpb	GANANCIA	228	0	187	20	>99,99 % (98,83 %)	90,34 % (86,42 %)
	PÉRDIDA	723	5	697	6	99,31 % (98,60 %)	99,15 % (98,36 %)
≥100 kpb	GANANCIA	371	1	335	5	99,73 % (98,80 %)	98,53 % (97,01 %)
	PÉRDIDA	541	23	569	1	95,92 % (94,32 %)	99,82 % (99,22 %)
General (todas las CNV ≥10 kpb)	GANANCIA	1,397	216	1,234	157	86,61 % (85,15 %)	88,71 % (87,24 %)
	PÉRDIDA	7,013	501	7,043	693	93,33 % (92,84 %)	91,04 % (90,49 %)

Tabla 16 Resumen de NPA de llamadas de CNV en TruSight Whole Genome

Tamaño	Tipo	Llamadas negativas concordantes	Llamadas negativas exclusivas del método de referencia	Llamadas exclusivas del ensayo	NPA (LCL)
General (todas las CNV ≥10 kpb)	GANANCIA	548,478,033,220	5,701,311	6,400,382	>99,99 % (>99,99 %)
	PÉRDIDA	548,591,794,675	11,719,913	8,543,877	>99,99 % (>99,99 %)

## Experimentos de precisión de homocigosis

El valor predictivo técnico positivo (TPPV) de las llamadas de ROH se evaluó utilizando el mismo método de referencia y muestras de sangre de donantes supuestamente sanos (195) que se utilizaron en las evaluaciones de precisión de variantes pequeñas y CNV. Los acontecimientos de ROH se determinaron mediante la identificación de regiones en el genoma que contenían una secuencia de llamadas de SNV homocigóticas que carecían de SNV heterocigóticas o huecos largos sin variantes. A continuación, dichas regiones de procedencia se extendieron hacia la izquierda y la derecha y se evaluaron en busca de llamadas homocigóticas circundantes o de la presencia de SNV heterocigóticas. Los eventos de ROH detectados por TruSight Whole Genome se compararon con las llamadas de SNV del método de referencia. En la [Tabla 17](#) se muestra un resumen de TPPV de las llamadas de ROH.

Tabla 17 TruSight Whole Genome Precisión de los eventos de ROH estratificados por tamaño

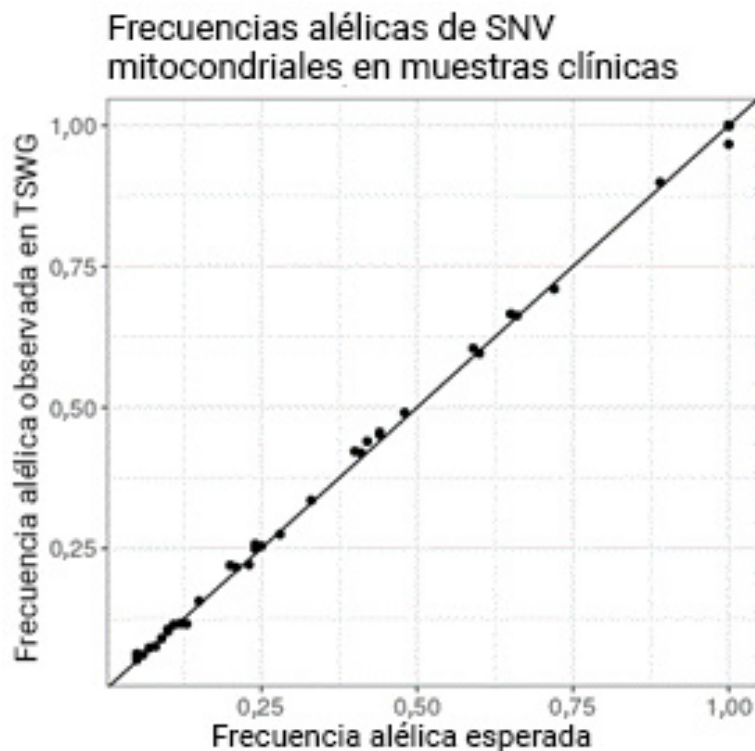
Tamaño	Media de TPPV	LCL TPPV
10–25 kpb	81,44 %	80,77 %
25–50 kpb	82,14 %	81,82 %
50–100 kpb	81,77 %	81,55 %
100–500 kpb	82,19 %	81,98 %
≥10 kpb	82,07 %	81,94 %
≥500 kpb	85,47 %	84,66 %

El porcentaje de concordancia positiva (PPA) para la detección de ROH se determinó en muestras clínicas de origen externo comparando las llamadas de TruSight Whole Genome con las llamadas de ROH mediante métodos ortogonales, incluida la micromatriz cromosómica y la evaluación basada en PCR. Se consideró detectado un evento de ROH si al menos el 50 % de la región notificada como ROH mediante el método ortogonal superponía la unión de los eventos de ROH llamados por TruSight Whole Genome. El PPA entre los métodos de Ensayo TruSight Whole Genome y ortogonales fue de 34/34 (100 %) para todos los eventos esperados de ROH (≥4 Mb).

### Precisión de SNV mitocondrial heteroplasmática

La precisión de las llamadas de mtSNV se evaluó en 41 muestras clínicas almacenadas previamente procedentes de centros externos. Cada muestra clínica contenía una mtSNV notificada previamente en un centro definido y con un grado definido de heteroplasmia basado en el análisis conocido dirigido al ADNmt con heteroplasmia (MITOP). Las frecuencias alélicas estimadas por TruSight Whole Genome estaban muy correlacionadas con las frecuencias esperadas según lo previsto por el MITOP. Se detectaron todas las SNV de ADNmt esperadas, lo que dio lugar a una PPA del 100 % (41/41).

Figura 3 Frecuencias alélicas observadas de SNV mitocondrial frente a frecuencias alélicas esperadas de TruSight Whole Genome



Se realizó un estudio adicional de exactitud de las mtSNV utilizando las mismas 195 muestras de sangre y el mismo método de referencia descrito en los estudios de precisión de variantes pequeñas y CNV. El conjunto de referencia negativa se definió como llamadas no variables seguras (filtro PASS SUPERADO) y el conjunto de referencia positiva se definió como llamadas mtSNV con una frecuencia alélica >2,5 %. Se excluyeron las posiciones que no superaban el filtro o una llamada de variante no SNV. En la [Tabla 18](#) se muestra un resumen de la precisión de las mtSNV.

Tabla 18 TruSight Whole Genome Precisión de las Llamadas SNV de ADNmt

Parámetro de precisión	Concordante del método de referencia positivo	Positivo exclusivo del método de referencia	Positivo exclusivo del ensayo	Concordante del método de referencia negativo	Negativo exclusivo del método de referencia	Negativo exclusivo del ensayo	Valor del parámetro de precisión (LCL)
PPA	6875	0	N/A	N/A	N/A	N/A	>99,99 % (99,96 %)
TPPV	6875	N/A	6	N/A	N/A	N/A	99,91 % (99,83 %)

Parámetro de precisión	Concordante del método de referencia positivo	Positivo exclusivo del método de referencia	Positivo exclusivo del ensayo	Concordante del método de referencia negativo	Negativo exclusivo del método de referencia	Negativo exclusivo del ensayo	Valor del parámetro de precisión (LCL)
NPA	N/A	N/A	N/A	3171049	24268	20564	99,24 % (99,23 %)

## Precisión de la detección de STR expandidas

La precisión de la detección de STR expandidas se basó en 160 muestras totales preparadas mediante extracción de ADN<sub>g</sub> de personas clínicamente afectadas con expansiones en centros específicos confirmadas mediante PCR/(RP)-PCR con cebado repetido o Southern Blot realizadas en un entorno de laboratorio CLIA. Los umbrales determinados en la [Tabla 11](#) se utilizaron para definir el estado de STR de un alelo en un locus específico como normal (tamaño de STR estimado menor o igual que el umbral) o expandido (mayor que el umbral).

La PPA se calculó utilizando solo muestras clínicamente confirmadas, la NPA se calculó utilizando solo muestras de sangre individuales supuestamente sanas y el TPPV se calculó en ambos grupos de muestras. Para los alelos en los que no se disponía de una muestra clínicamente confirmada, no se pudo calcular la PPA. Además, en el caso de los alelos en los que no se disponía de una muestra clínicamente confirmada y no hubo resultados positivos falsos, no se pudo calcular el VPPT. Se calculó la NPA de todas las expansiones de STR. El número de muestras clínicas analizadas para una STR expandida determinada y los parámetros de precisión se proporcionan en la [Tabla 19](#).

Tabla 19 TruSight Whole Genome Parámetros de precisión de STR expandidas

STR expandidas	Muestras clínicas analizadas	PPA	TPPV	NPA
AFF2	0	N/A	N/A	>99,99 %
AR	8	>99,99 %	>99,99 %	>99,99 %
ATN1	4	>99,99 %	>99,99 %	>99,99 %
ATXN1	7	66,67 %	>99,99 %	>99,99 %
ATXN10	0	N/A	N/A	>99,99 %
ATXN2	5	80,00 %	>99,99 %	>99,99 %
ATXN3	9	>99,99 %	90,00 %	99,74 %
ATXN7	2	>99,99 %	>99,99 %	>99,99 %
ATXN7_CCG	0	N/A	N/A	>99,99 %
ATXN8OS	0	N/A	0,00 %	99,74 %

STR expandidas	Muestras clínicas analizadas	PPA	TPPV	NPA
ATXN8OS_CTA	0	N/A	N/A	>99,99 %
C9ORF72	21	>99,99 %	>99,99 %	>99,99 %
CACNA1A	5	>99,99 %	83,33 %	99,74 %
CBL	0	N/A	N/A	>99,99 %
CNBP	0	N/A	N/A	>99,99 %
CNBP_CA	0	N/A	N/A	>99,99 %
CNBP_CAGA	0	N/A	N/A	>99,99 %
CSTB	0	N/A	0,00 %	99,74 %
DIP2B	0	N/A	0,00 %	99,74 %
DMPK	42	>99,99 %	>99,99 %	>99,99 %
FMR1	47	>99,9 %	>99,99 %	>99,99 %
FXN	0	N/A	0,00 %	99,74 %
FXN_A	0	N/A	N/A	>99,99 %
GLS	0	N/A	N/A	>99,99 %
HTT	10	>99,99 %	83,33 %	99,49 %
HTT_CCG	0	N/A	N/A	>99,99 %
JPH3	0	N/A	N/A	>99,99 %
NIPA1	0	N/A	N/A	>99,99 %
NOP56	0	N/A	N/A	>99,99 %
NOP56_CGCCTG	0	N/A	N/A	>99,99 %
NOTCH2NL	0	N/A	N/A	>99,99 %
PABPN1	0	N/A	N/A	>99,99 %
PHOX2B	0	N/A	N/A	>99,99 %
PPP2R2B	0	N/A	N/A	>99,99 %
TBP	0	N/A	N/A	>99,99 %
<b>TODAS</b>	<b>160</b>	<b>98,12 %</b>	<b>92,35 %</b>	<b>99,94 %</b>

La evaluación de la PPA general de la detección de STR expandidas en todos los locus representa una buena aproximación de la PPA específica del locus utilizando las muestras clínicas disponibles. La evaluación de la PPA específica del locus FMR1 puede servir como límite inferior para la PPA de los locus que no se perfilaron directamente debido a su gran umbral para la anomalía del tamaño de STR.

### Precisión de la detección de alelos SMN1

La precisión de la detección de la ausencia del alelo C en SMN1 (NM\_000344.3:c.840C) se evaluó en 26 muestras clínicas de casos con diagnóstico de atrofia muscular espinal (AME) y pérdida homocigótica del exón 7 en SMN1 confirmada mediante Digital Droplet PCR o MLPA. La precisión de la identificación de la presencia del alelo c.840C de SMN1 se evaluó en muestras de sangre individuales supuestamente sanas. A cada muestra se le asignó un único parámetro estadístico (Verdadero positivo [TP], Falso positivo [FP], Falso negativo [FN] o Negativo verdadero [TN]) en función de la presencia detectada (estado de AME negativo) o ausencia (estado de AME positivo) del alelo C en la posición c.840 del gen SMN1 en comparación con el estado esperado. Las estimaciones de PPA, TPPV y NPA se realizaron tanto en el conjunto de muestras positivas como en el negativo (consulte la [Tabla 20](#)).

Tabla 20 Parámetros de precisión para la detección de ausencias de alelos SMN1 c.840C

Parámetro de precisión	TP	FP	TN	FN	Valor del parámetro de precisión
PPA	26	N/A	N/A	0	>99,99 %
TPPV	26	0	N/A	N/A	>99,99 %
NPA	N/A	0	195	N/A	>99,99 %

## Repetibilidad

### Precisión dentro del laboratorio

La precisión dentro del laboratorio se evaluó utilizando ADNg extraído con diversas variantes conocidas en todo el genoma. Estas incluían mtSNVs (variantes de nucleótido único del ADN mitocondrial) cerca y muy por encima del LoD, muestras que contenían el alelo SMN1 c.840C y muestras con expansiones repetidas de los genes FMR y HTT1 en longitudes cercanas y muy por encima del LoD. Las muestras se analizaron utilizando nueve condiciones únicas diseñadas con tres operadores, tres lotes de reactivos de preparación de genotecas, tres lotes de consumibles de secuenciación y tres instrumentos de secuenciación.

Cada muestra se analizó por duplicado en el mismo experimento para evaluar la variación dentro de cada experimento, y cada caso de prueba se analizó dos veces en dos experimentos por condición por la variación entre experimentos. Cada muestra se evaluó mediante 36 observaciones y el diseño proporcionó 18 grados de libertad para evaluar la repetibilidad. La lista de elementos del panel, el tipo de muestra y las variantes evaluadas por cada elemento del panel se muestran en la [Tabla 21](#). Las muestras 1-4 y 9-12 procedían de hombres y mujeres de ascendencia autoidentificada como caucásica, africana y asiática para proporcionar un conjunto de muestras diverso.



Tabla 21 Composición de la muestra del panel utilizado para el estudio de precisión dentro del laboratorio

Panel	N.º de muestra	Tipo de muestra	Variantes
A	1	ADNg de sangre	Variantes pequeñas, CNV (variación del número de copias), ROH (regiones de homocigosis), STR (repeticiones cortas en tándem) no expandidas, presencia de SMN1 c.840C
	2	ADNg de sangre	Variantes pequeñas, CNV (variación del número de copias), ROH (regiones de homocigosis), STR (repeticiones cortas en tándem) no expandidas, presencia de SMN1 c.840C
	3	ADNg de sangre	Variantes pequeñas, CNV (variación del número de copias), ROH (regiones de homocigosis), STR (repeticiones cortas en tándem) no expandidas, presencia de SMN1 c.840C
	4	ADNg de sangre	Variantes pequeñas, CNV (variación del número de copias), ROH (regiones de homocigosis), STR (repeticiones cortas en tándem) no expandidas, presencia de SMN1 c.840C
	5	Mezcla artificial de ADNg de sangre	SNV (variantes de nucleótido único) mitocondriales a nivel de LoD bajo
	6	Línea celular artificial NA20241 <sup>1</sup>	STR expandidas en locus FMR1 a nivel de LoD bajo
	7	Línea celular artificial NA20208	STR expandidas en locus HTT a nivel de LoD bajo
	8	Línea celular artificial NA23686	Ausencia de SMN1 c.840C

Panel	N.º de muestra	Tipo de muestra	Variantes
B	9	ADNg de sangre	Variantes pequeñas, CNV (variación del número de copias), ROH (regiones de homocigosis), STR (repeticiones cortas en tándem) no expandidas, presencia de SMN1 c.840C
	10	ADNg de sangre	Variantes pequeñas, CNV (variación del número de copias), ROH (regiones de homocigosis), STR (repeticiones cortas en tándem) no expandidas, presencia de SMN1 c.840C
	11	ADNg de sangre	Variantes pequeñas, CNV (variación del número de copias), ROH (regiones de homocigosis), STR (repeticiones cortas en tándem) no expandidas, presencia de SMN1 c.840C
	12	ADNg de sangre	Variantes pequeñas, CNV (variación del número de copias), ROH (regiones de homocigosis), STR (repeticiones cortas en tándem) no expandidas, presencia de SMN1 c.840C
	13	Mezcla artificial de ADNg de sangre	mtSNV a nivel de LoD alto
	14	Línea celular artificial NA07862	STR expandidas en locus FMR1 a nivel de LoD alto
	15	Línea celular artificial NA20253	STR expandidas en locus HTT a nivel de LoD alto
	16	Línea celular artificial NA03814	Ausencia de SMN1 c.840C

Nivel de LoD alto: Frecuencia alélica de variantes aproximadamente a 2,0x – 4,0x LoD.

Nivel de LoD bajo: Frecuencia alélica de variantes aproximadamente a 1,0x – 1,5x LoD.

<sup>1</sup> Los resultados de NA20241 no se incluyeron en las cifras finales, ya que se determinó que estaban significativamente por debajo del LoD 1,0x, y, por lo tanto, no cumplían los requisitos de la muestra.

En la evaluación cualitativa, se informa de los parámetros de reproducibilidad tratando las variantes como entidades cualitativas (variante presente o variante no presente). Se evaluaron y notificaron diferentes definiciones de llamadas positivas o negativas y diferentes parámetros cualitativos para cada tipo de variante (Tabla 22). Al evaluar la reproducibilidad de las variantes pequeñas, CNV y ROH, se utilizaron llamadas de variantes realizadas en una réplica de experimento de caracterización por cada muestra que sirvió como punto de comparación para todas las demás réplicas de esa muestra en el estudio.

Tabla 22 Resumen de la evaluación cualitativa de la reproducibilidad para cada tipo de variante

Tipo de variante	Positivo	Negativo	Tipo de comparación	Parámetros cualitativos
Variantes pequeñas	Llamada de variantes que supera los filtros	Llamada de referencias homocigóticas que supera los filtros	Concordancia con el conjunto de llamadas de los experimentos de caracterización inicial	Concordancia media positiva (APA) y concordancia media negativa (ANA)
CNV	Llamada de CNV que supera los filtros	Las posiciones genómicas no se superponen a la llamada de variantes de número de copia que superan el filtro	Concordancia con el conjunto de llamadas de los experimentos de caracterización inicial	APA y ANA
ROH	Llamada ROH	Las posiciones genómicas no se superponen a la llamada ROH	Concordancia con el conjunto de llamadas de los experimentos de caracterización inicial	APA y ANA
STR expandidas	Muestra con STR expandidas en al menos un locus diana	Muestra sin expansiones en ninguno de los locus diana	Concordancia con el estado de la muestra definido por la caracterización de la muestra por ensayo ortogonal	Porcentaje de llamadas positivas (PPC) y porcentaje de llamadas negativas (PNC)
Detección de SMN1 c.840C	Muestra sin el alelo C en la posición 840 de SMN1 (AME positiva)	Muestra que contiene al menos una copia del alelo C en la posición 840 de SMN1 (AME negativa)	Concordancia con el estado de la muestra definido por la caracterización de la muestra por ensayo ortogonal	PPC y PNC
mtSNV	Llamada de SNV mitocondrial que supera los filtros	Posición invariable en los cromosomas mitocondriales que superan los filtros	Concordancia con las llamadas de variantes y no variantes realizadas en muestras sin diluir	PPC y PNC

La evaluación cuantitativa de los distintos tipos de variantes consistió en una evaluación de la variabilidad de los parámetros cuantitativos que sustentan las llamadas cualitativas o, en el caso de las variantes pequeñas, de los parámetros de concordancia en relación con un conjunto de llamadas de referencia. Este estudio realizó

tanto una evaluación de la variabilidad total en los parámetros cuantitativos entre réplicas como de la contribución de los distintos factores incluidos en el estudio a la variabilidad en dichos parámetros cuantitativos mediante el análisis de componentes de varianza. La [Tabla 23](#) resume los parámetros cuantitativos utilizados en el análisis de cada tipo de variante, así como los factores cuya contribución a la variabilidad en el parámetro cuantitativo se evaluó.

Tabla 23 Resumen de los parámetros cuantitativos utilizados en la evaluación de la precisión para los distintos tipos de variantes

Tipo de variante	Parámetros cuantitativos	Factores evaluados por su contribución a la variabilidad
Variantes pequeñas	APA y ANA	Operador, lote de kit de preparación de genotecas, instrumento, lote de consumibles de secuenciación, subtipo de las variantes, contexto genómico
CNV	Profundidad de cobertura normalizada sobre la región de CNV	Operador, lote de kit de preparación de genotecas, instrumento, lote de consumibles de secuenciación, subtipo de las variantes, longitud de las variantes
ROH	Puntuación de ROH sobre la región de ROH	Operador, lote de kit de preparación de genotecas, instrumento, lote de consumibles de secuenciación, subtipo de las variantes, longitud de las variantes
STR expandidas	Estimación del tamaño de la STR	Operador, lote de kit de preparación de genotecas, instrumento, lote de consumibles de secuenciación, centro de las STR, longitud de las STR
Detección de SMN1 c.840C	Relación de probabilidad logarítmica para la presencia del alelo de referencia (C) en la posición diana	Operador, lote de kit de preparación de genotecas, instrumento, lote de consumibles de secuenciación, estado de AME
SNV mitocondriales	Frecuencia alélica de variantes	Operador, lote de kit de preparación de genotecas, instrumento, lote de consumibles de secuenciación, posición de las variantes, frecuencia alélica esperada de las variantes

Los resultados del análisis de los componentes de la varianza se presentan en la [Tabla 24](#). En el caso de las variantes pequeñas, la mayor parte de la varianza se atribuyó a un error residual y no se explicó por los factores relacionados con el ensayo incluidos en el diseño, como el lote del kit de secuenciación, el instrumento de secuenciación, el lote del kit de preparación de genotecas, el operador y cada experimento. La única excepción se observó en las SNV de las regiones de confianza intermedia, para las que la mayor parte de la varianza se atribuyó al lote del kit de secuenciación. En general, se atribuyó una mayor cantidad de varianza a factores relacionados con el ensayo para las variantes pequeñas en regiones de baja confianza del genoma. Para todos los demás tipos de variantes, la mayoría de la varianza se atribuyó a errores residuales y no a factores relacionados con el ensayo. Este estudio demuestra que, para la mayoría de los subtipos de variantes

pequeñas, se puede utilizar el filtrado para regiones de confianza alta e intermedia en el genoma para aumentar la repetibilidad y disminuir la variabilidad del ensayo. La sección [Reproducibilidad externa, en la página 69](#) proporciona un análisis exhaustivo de la reproducibilidad del ensayo.

Tabla 24 Resultados del estudio de análisis de componentes de varianza

Criterio de medición	Subtipos de variantes	Nivel de confianza	SD	Lote del kit de secuenciación	Experimento a experimento	Instrumento	Kit de preparación de genotecas	Operador
APA	Delección breve (1–5 pb)	Alto	79,36 %	17,52 %	0,00 %	0,00 %	3,13 %	0,00 %
		Intermedio	76,97 %	18,59 %	1,53 %	0,00 %	2,91 %	0,00 %
		Bajo	67,85 %	24,87 %	4,4 %	0,00 %	2,88 %	0,00 %
	Delección media (6–15 pb)	Intermedio	61,17 %	29,06 %	7,42 %	0,00 %	2,35 %	0,00 %
		Bajo	59,33 %	31,76 %	6,38 %	0,17 %	2,35 %	0,00 %
	Delección larga (16–31 pb)	Intermedio	52,93 %	33,72 %	11,67 %	0,17 %	1,51 %	0,00 %
		Bajo	49,10 %	37,01 %	11,08 %	1,42 %	1,39 %	0,00 %
	Inserción corta (1–5 pb)	Alto	89,93 %	7,32 %	1,76 %	0,00 %	0,99 %	0,00 %
		Intermedio	74,52 %	19,96 %	3,44 %	0,00 %	2,08 %	0,00 %
		Bajo	60,64 %	29,72 %	8,49 %	0,00 %	1,15 %	0,00 %
	Inserción media (6–15 pb)	Intermedio	81,76 %	15,78 %	0,00 %	0,00 %	2,41 %	0,06 %
		Bajo	51,28 %	35,07 %	12,07 %	0,00 %	1,58 %	0,00 %
	Inserción larga (16–31 pb)	Intermedio	87,59 %	9,83 %	1,18 %	0,00 %	1,40 %	0,00 %
		Bajo	52,47 %	35,32 %	10,14 %	0,23 %	1,85 %	0,00 %
	SNV	Alto	78,01 %	17,45 %	0,00 %	0,13 %	1,23 %	3,17 %
Intermedio		79,71 %	16,95 %	0,77 %	0,20 %	1,29 %	1,09 %	
Bajo		56,63 %	36,08 %	6,97 %	0,22 %	0,00 %	0,09 %	

Criterio de medición	Subtipos de variantes	Nivel de confianza	SD	Lote del kit de secuenciación	Experimento a experimento	Instrumento	Kit de preparación de genotecas	Operador
ANA	SNV	Alto	55,07 %	21,84 %	21,07 %	1,80 %	0,21 %	0,00 %
		Intermedio	28,53 %	49,08 %	20,11 %	1,27 %	1,00 %	0,00 %
		Bajo	51,78 %	36,04 %	9,76 %	2,42 %	0,00 %	0,00 %

Criterio de medición	Subtipos de variantes	Nivel de confianza	SD	Lote del kit de secuenciación	Experimento a experimento	Instrumento	Kit de preparación de genotecas	Operador
Profundidad	GANANCIA DE CNV (10 kpb, 25 kpb)	N/A	73,28 %	2,87 %	0,00 %	0,00 %	1,01 %	0,00 %



Criterio de medición	Subtipos de variantes	Nivel de confianza	SD	Lote del kit de secuenciación	Experimento a experimento	Instrumento	Kit de preparación de genotecas	Operador
	GANANCIA DE CNV (25 kpb, 50 kpb)	N/A	72,99 %	5,25 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,56 %

Criterio de medición	Subtipos de variantes	Nivel de confianza	SD	Lote del kit de secuenciación	Experimento a experimento	Instrumento	Kit de preparación de genotecas	Operador
	GANANCIA DE CNV (50 kpb, 100 kpb)	N/A	66,40 %	5,16 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	GANANCIA DE CNV (100 kpb, 500 kpb)	N/A	43,51 %	14,92 %	14,01 %	0,20 %	0,00 %	15,72 %
	PÉRDIDA DE CNV (10 kpb, 25 kpb)	N/A	83,41 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	PÉRDIDA DE CNV (25 kpb, 50 kpb)	N/A	84,67 %	1,20 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	PÉRDIDA DE CNV (50 kpb, 100 kpb)	N/A	84,16 %	2,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	PÉRDIDA DE CNV (100 kpb, 500 kpb)	N/A	81,25 %	5,22 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,55 %

Criterio de medición	Subtipos de variantes	Nivel de confianza	SD	Lote del kit de secuenciación	Experimento a experimento	Instrumento	Kit de preparación de genotecas	Operador
Puntuación sobre la región	ROH (1 kpb, 10 kpb)	N/A	74,32 %	1,65 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,52 %
	ROH (10 kpb, 25 kpb)	N/A	84,78 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (25 kpb, 50 kpb)	N/A	84,92 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (50 kpb, 100 kpb)	N/A	85,63 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (100 kpb, 500 kpb)	N/A	85,76 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH: ≥500 kpb	N/A	84,81 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

Criterio de medición	Subtipos de variantes	Nivel de confianza	SD	Lote del kit de secuenciación	Experimento a experimento	Instrumento	Kit de preparación de genotecas	Operador
Estimación del tamaño de los locus STR <sup>1</sup>	AFF2	N/A	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ATXN7	N/A	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ATXN7_CCG	N/A	99,43 %	0,57 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNBP	N/A	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNBP_CA	N/A	95,45 %	4,55 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CSTB	N/A	96,45 %	0,87 %	2,57 %	0,00 %	0,00 %	0,11 %
	DIP2B	N/A	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	FMR1	N/A	71,02 %	10,06 %	0,00 %	17,33 %	0,64 %	0,95 %
	FXN_A	N/A	94,52 %	1,37 %	0,00 %	1,37 %	1,37 %	1,37 %
	HTT	N/A	82,23 %	0,00 %	11,99 %	3,81 %	0,00 %	1,97 %
	HTT_CCG	N/A	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	NOTCH2NL	N/A	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,29 %	0,29 %	0,00 %
	TBP	N/A	90,91 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
Cociente de verosimilitud logarítmica	c.840C en NA03814	N/A	65,71 %	18,98 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	15,32 %
	c.840C en NA23686	N/A	87,64 %	0,00 %	0,00 %	5,90 %	0,00 %	6,46 %
VAF	mtSNV cerca del LOD	N/A	83,13 %	0,37 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,05 %

<sup>1</sup> No se realizó un análisis de componentes de varianza de los locus en los que no se observó varianza.

## Instrucciones de uso

### Reproducibilidad externa

La reproducibilidad externa se determinó utilizando un único lote de reactivos de preparación de genotecas y secuenciación en tres centros de ensayo externos con dos operadores en cada centro. Las mismas muestras utilizadas en el estudio [Precisión dentro del laboratorio, en la página 56 \(Tabla 21\)](#) se utilizaron en el estudio de reproducibilidad con una excepción: la muestra NA20241 se sustituyó por NA20239 para evaluar las STR expandidas del locus FMR1 a un LoD bajo. En total, se analizaron 16 muestras únicas como dos subpaneles de ocho muestras únicas cada uno (panel A y panel B) por cada operador en cada centro. Se realizaron tres experimentos de secuenciación para las genotecas duplicadas de cada subpanel para un total de 36 ciclos de secuenciación por muestra única.

La tasa de aprobación de muestras en 576 genotecas de muestras con experimentos de secuenciación válidos, definida como el número de muestras que superan los parámetros de CC de la genoteca de muestras en el primer intento, fue del 99,1 % (571/576; IC del 95 %: 98,0 %, 99,6 %). Los resultados de todas las pruebas se basan en la prueba inicial.

La reproducibilidad de SNV, inserciones, deleciones, CNV y ROH se evaluó comparando los datos con un conjunto de llamadas de referencia basado en el rendimiento habitual en tres experimentos de caracterización ([Tabla 25](#) y [Tabla 26](#)). Se evaluó la reproducibilidad de las STR expandidas, la ausencia del alelo c.840C de SMN1 y las SNVmt comparando los datos con el estado conocido ([Tabla 27](#)).

Tabla 25 Reproducibilidad de TruSight Whole Genome para SNV, CNV y ROH

Tipo de variante: estratificación	Llamadas positivas concordantes <sup>1</sup> / Llamadas positivas <sup>2</sup>			Promedio de concordancia positiva (%) (IC del 95 %) <sup>3</sup>
	Centro 1	Centro 2	Centro 3	
<b>Variantes pequeñas (alta confianza)</b>				
SNV	687,996,150 /	666,509,635 /	688,001,697 /	99,9
	688,770,402	667,253,493	688,766,887	(99,9–99,9)
Inserciones (1–5 pb)	34,087,135 /	33,025,772 /	34,089,204 /	99,9
	34,137,298	33,073,087	34,137,792	(99,9–99,9)
Deleciones (1–5 pb)	44,096,186 /	42,733,935 /	44,102,515 /	99,6
	44,255,442	42,883,089	44,256,695	(99,6–99,6)
<b>Variantes pequeñas (confianza intermedia)</b>				
SNV	42,238,226 /	40,920,370 /	42,236,751 /	98,8
	42,737,228	41,391,560	42,725,827	(98,8–98,9)
Inserciones (1–5 pb)	11,075,073 /	10,734,488 /	11,080,468 /	98,9
	11,204,210	10,855,790	11,204,818	(98,9–99,9)
Inserciones (6–15 pb)	4,307,181 /	4,173,626 /	4,308,408 /	99,3
	4,339,975	4,205,261	4,340,277	(99,2–99,3)
Inserciones (≥16 pb)	611,952 /	593,114 /	612,222 /	96,8
	632,214	612,877	632,498	(96,8–96,8)
Deleciones (1–5 pb)	24,571,502 /	23,814,655 /	24,586,095 /	98,9
	24,851,492	24,076,930	24,855,041	(98,9–98,9)
Deleciones (6–15 pb)	8,737,319 /	8,473,410 /	8,746,773 /	98,2
	8,900,796	8,624,403	8,902,016	(98,2–98,2)
Deleciones (≥16 pb)	3,590,282 /	3,481,192 /	3,594,420 /	95,0
	3,779,907	3,662,448	3,780,659	(95,0–95,0)
<b>Variantes pequeñas (baja confianza)</b>				
SNV	78,507,103 /	76,365,789 /	78,863,977 /	81,2
	96,859,682	94,066,720	97,058,652	(81,2–81,2)

Tipo de variante: estratificación	Llamadas positivas concordantes <sup>1</sup> / Llamadas positivas <sup>2</sup>			Promedio de concordancia positiva (%) (IC del 95 %) <sup>3</sup>
	Centro 1	Centro 2	Centro 3	
Inserciones (1–5 pb)	17,312,805 /	16,859,987 /	17,406,355 /	89,6
	19,370,351	18,807,745	19,418,516	(89,5–89,6)
Inserciones (6–15 pb)	5,543,985 /	5,404,652 /	5,584,241 /	85,1
	6,529,886	6,338,556	6,550,066	(85,1–85,2)
Inserciones (≥16 pb)	3,284,197 /	3,205,165 /	3,314,025 /	77,0
	4,275,286	4,158,315	4,298,399	(77,0–77,0)
Deleciones (1–5 pb)	31,659,416 /	30,751,952 /	31,746,379 /	92,7
	34,194,748	33,158,757	34,226,245	(92,7–92,7)
Deleciones (6–15 pb)	9,189,220 /	8,928,794 /	9,217,516 /	92,1
	9,987,568	9,684,179	9,995,101	(92,1–92,2)
Deleciones (≥16 pb)	3,335,400 /	3,241,968 /	3,346,219 /	85,4
	3,909,364	3,791,331	3,912,857	(85,4–85,5)
<b>CNV: ganancias ≥10 kpb</b>	7,883 /	7,664 /	7,916 /	95,5
	8,275	8,012	8,282	(95,2–95,8)
<b>CNV: pérdidas ≥10 kpb</b>	11,517 /	11,248 /	11,516 /	95,3
	12,089	11,777	12,113	(95,1–95,5)
<b>ROH: ≥500 kpb</b>	6,641 /	6,519 /	6,616 /	98,0
	6,765	6,663	6,756	(97,8–98,2)

<sup>1</sup> Número total de llamadas positivas concordantes = Concordante de consulta positivo (QCP) + Concordante de referencia positivo (RCP).

<sup>2</sup> Número total de llamadas positivas = Concordante de consulta positivo (QCP) + Positivo exclusivo de consulta (QEP) + Concordante de referencia positivo (RCP) + Positivo exclusivo de referencia (REP).

<sup>3</sup> Intervalo de confianza bilateral del 95 % calculado a través del método de puntuación de Wilson.

Tabla 26 Reproducibilidad de TruSight Whole Genome para ANA de SNV, CNV y ROH

Tipo de variante: estratificación	Llamadas negativas concordantes <sup>1</sup> / Llamadas negativas <sup>2</sup>			Promedio de concordancia negativa (%) (IC del 95 %) <sup>3</sup>
	Centro 1	Centro 2	Centro 3	
Variantes pequeñas (alta confianza)	486,282,620,918 /	470,948,205,740 /	486,285,759,770 /	>99,9
	486,388,081,375	471,054,131,230	486,389,857,817	(>99,9->99,9)
Variantes pequeñas (confianza intermedia)	17,249,915,828 /	16,699,106,194 /	17,253,834,878 /	99,0
	17,427,817,811	16,874,794,553	17,429,035,482	(99,0-99,0)
Variantes pequeñas (baja confianza)	24,072,615,254 /	23,454,103,344 /	24,180,801,788 /	94,0
	25,608,493,410	24,947,163,687	25,695,956,102	(94,0-94,0)
CNV: ganancias ≥10 kpb	592,486,270,144 /	573,973,293,084 /	592,487,297,632 /	>99,9
	592,500,222,476	573,985,772,396	592,500,614,241	(>99,9->99,9)
CNV: pérdidas ≥10 kpb	592,548,802,882 /	574,030,570,254 /	592,547,683,360 /	>99,9
	592,559,825,216	574,041,311,257	592,559,141,007	(>99,9->99,9)
ROH: ≥500 kpb	542,968,586,606 /	525,724,060,526 /	543,014,319,116 /	99,2
	547,402,885,905	530,011,754,808	547,444,495,449	(99,2-99,2)

<sup>1</sup> Número total de llamadas negativas concordantes = 2 × negativo concordante (CN).

<sup>2</sup> Número total de llamadas negativas = 2 × negativo concordante (CN) + negativo exclusivo de referencia (REN) + negativo exclusivo de consulta (QEN).

<sup>3</sup> Intervalo de confianza bilateral del 95 % calculado a través del método de puntuación de Wilson.



Tabla 27 Reproducibilidad de TruSight Whole Genome para STR, SMN1 y mtSNV

Tipo de variante: estratificación	Total de llamadas positivas esperadas	Llamadas positivas			Total de llamadas negativas esperadas	Llamadas negativas			Porcentaje de llamadas positivas (IC del 95 %) <sup>1</sup>	Porcentaje de llamadas negativas (IC del 95 %) <sup>1</sup>
		Centro 1	Centro 2	Centro 3		Centro 1	Centro 2	Centro 3		
<b>STR expandidas: alto nivel de detección (2x–4x LOD)</b>										
STR expandidas: FMR1	35	12	11	12	N/A	N/A	N/A	N/A	100 (90,1–100)	N/A
STR expandidas: HTT	36	12	12	12	N/A	N/A	N/A	N/A	100 (90,4–100)	N/A
STR expandidas: FMR1 y HTT combinados	71	24	23	24	N/A	N/A	N/A	N/A	100 (94,9–100)	N/A
<b>STR expandidas: bajo nivel de detección (1x–1,5x LOD)</b>										
STR expandidas: FMR1	36	11	10	11	N/A	N/A	N/A	N/A	88,9 (74,7–95,6)	N/A
STR expandidas: HTT	36	12	12	12	N/A	N/A	N/A	N/A	100 (90,4–100)	N/A
STR expandidas: FMR1 y HTT combinados	72	23	22	23	N/A	N/A	N/A	N/A	94,4 (86,6–97,8)	N/A

Tipo de variante: estratificación	Total de llamadas positivas esperadas	Llamadas positivas			Total de llamadas negativas esperadas	Llamadas negativas			Porcentaje de llamadas positivas (IC del 95 %) <sup>1</sup>	Porcentaje de llamadas negativas (IC del 95 %) <sup>1</sup>
		Centro 1	Centro 2	Centro 3		Centro 1	Centro 2	Centro 3		
STR expandidas: 28 locus STR diana principales combinados	N/A	N/A	N/A	N/A	285	96	93	96	N/A	100 (98,7–100)
Ausencia de SMN1 c.840C	71	24	24	23	285	96	93	96	100 (94,9–100)	100 (98,7–100)
mtSNV: nivel alto (2x–4x LOD)	1080	360	360	360	457,524	152,491	152,489	152,484	100 (99,6–100)	>99,9 (>99,9–>99,9)
mtSNV: nivel bajo (1x–1,5x LOD)	1080	360	359	360	457,524	152,481	152,489	152,483	99,9 (99,5–99,9)	>99,9 (>99,9–>99,9)

<sup>1</sup> Intervalo de confianza bilateral del 95 % calculado a través del método de puntuación de Wilson.

# Solución de problemas

Use la siguiente tabla para solucionar los problemas que surjan durante el flujo de trabajo. Si un experimento de secuenciación o la preparación de genotecas para una muestra falla dos veces, puede ser necesaria una resolución de problemas adicional. Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

Tipo de problema	Observación	Posible causa	Acción recomendada
Problema de creación de experimento	El experimento planificado asociado no se puede seleccionar manualmente en Software de control NovaSeq 6000Dx después de cargar consumibles	Se especificó un ID de tubo de genoteca incorrecto durante la planificación del experimento	Consulte Revisión de experimento en Guía de TruSight Whole Genome Analysis Application (n.º de documento 200049931).

Tipo de problema	Observación	Posible causa	Acción recomendada
Problema en la secuenciación	Estado de fallo de secuenciación en Illumina Run Manager	El experimento de secuenciación se ha cancelado o no se ha podido completar debido a un problema de NovaSeq 6000Dx o de manipulación de consumibles de secuenciación	<p>Consulte Documentación de NovaSeq 6000Dx Instrument (documento #200010105).</p> <p>Tras solucionar el problema, la genoteca puede volver a agruparse y secuenciarse hasta una vez (debido al volumen).</p>
		Experimento completado pero no agrupado. Posible problema de NovaSeq 6000Dx, problema de manipulación de consumibles de secuenciación o fallo catastrófico en la preparación de la genoteca debido a un problema de manipulación de reactivos o a un error del operador (por ejemplo, se saltó un paso o desechó en lugar de transferir el sobrenadante durante la selección del tamaño).	<p>Evalúe los rendimientos individuales de las genotecas en FLP mediante qPCR para <math>\geq 0,94</math> nM (suponiendo un tamaño de inserto de 450 pb) para descartar problemas relacionados con la preparación de las genotecas o con la secuenciación.</p> <p>Si se descartan los problemas de preparación de la genoteca y se sospecha de un problema relacionado con la secuenciación, consulte Documentación de NovaSeq 6000Dx Instrument (documento #200010105).</p> <p>Si se sospecha de un problema de preparación de la genoteca, revise <a href="#">Sugerencias y técnicas, en la página 14</a> e <a href="#">Instrucciones de uso, en la página 17</a> antes de repetir la preparación y secuenciación de la genoteca. Si hay fallos repetidos, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.</p>

<b>Tipo de problema</b>	<b>Observación</b>	<b>Posible causa</b>	<b>Acción recomendada</b>
Los datos de secuenciación no se transfieren al servidor	Transferencia de archivos de secuenciación para el estado de fallo de análisis en Illumina Run Manager	Problema de conectividad de red o interrupción de la alimentación del instrumento o servidor durante la transferencia de datos del experimento	<p>Compruebe si se ha producido una interrupción del suministro eléctrico o una pérdida de conectividad de red del instrumento. Espere a que el sistema esté inactivo (que se complete la secuenciación) y, a continuación, vaya a Instrument Settings, IVD SETTINGS para confirmar la conexión con la ubicación de salida especificada mediante la función Browse.</p>
			<p>Si es necesario solucionar más problemas, consulte Documentación de NovaSeq 6000Dx Instrument (documento #200010105). Si después de resolver los problemas de conexión o de alimentación, la transferencia de archivos no se reinicia y completa, póngase en contacto con el servicio técnico de Illumina.</p>

Tipo de problema	Observación	Posible causa	Acción recomendada
No se puede iniciar el análisis	No se inició el estado del análisis en Illumina Run Manager aunque se completó la transferencia del archivo de secuenciación para el análisis	Emparejamiento o conexión entre el instrumento y DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx perdidos o licencia de DRAGEN caducada.	<p>Espera a que el sistema esté inactivo (que se complete la secuenciación) y, a continuación, vaya a DRAGEN para confirmar que la licencia de DRAGEN es válida. Si la licencia ha caducado, póngase en contacto con Illumina. Si la licencia es válida, seleccione <b>Run Self-Test</b>. Si la prueba falla, o si la opción de ejecutar una autocomprobación no está disponible, inicie sesión en Instrument para comprobar si hay un error relacionado con el emparejamiento del servidor. Consulte la sección Configuración del sistema del Documentación de NovaSeq 6000Dx Instrument (documento #200010105).</p> <p>El análisis debe iniciarse automáticamente después de resolver el problema. Salga de la página y vaya a la página Active Runs (Experimentos activos) para confirmar que el análisis está en curso. Si el problema persiste, póngase en contacto con Illumina.</p>

<b>Tipo de problema</b>	<b>Observación</b>	<b>Posible causa</b>	<b>Acción recomendada</b>
El análisis se queda atascado	Análisis en curso en Illumina Run Manager durante mucho más tiempo del esperado	Es posible que la conectividad de la red o la alimentación del instrumento o del servidor se haya interrumpido durante el análisis, provocando que se atasque	<p>Cancele el análisis y compruebe si se ha producido una interrupción del suministro eléctrico o una pérdida de conectividad de la red de instrumentos.</p> <p>Espera a que el sistema esté inactivo (que se complete la secuenciación) y, a continuación, vaya a Instrument Settings (IVD SETTINGS) para confirmar la conexión con la ubicación de salida especificada. Si es necesario solucionar más problemas, consulte Documentación de NovaSeq 6000Dx Instrument (documento #200010105).</p> <p>Tras solucionar el problema, vuelva a poner el análisis en cola sin cambios. Consulte Guía de TruSight Whole Genome Analysis Application (n.º de documento 200049931).</p>

Tipo de problema	Observación	Posible causa	Acción recomendada
Los archivos de análisis no se pueden transferir	La transferencia del archivo de análisis al almacenamiento ha fallado en Illumina Run Manager	Problema de conectividad de red o interrupción de la alimentación del instrumento o servidor durante la transferencia del archivo de análisis	<p>Cancele el análisis y compruebe si se ha producido una interrupción del suministro eléctrico o una pérdida de conectividad de la red de instrumentos.</p> <p>Espera a que el sistema esté inactivo (que se complete la secuenciación) y, a continuación, vaya a Instrument Settings (IVD SETTINGS) para confirmar la conexión con la ubicación de salida especificada. Si es necesario solucionar más problemas, consulte Documentación de NovaSeq 6000Dx Instrument (documento #200010105).</p> <p>Tras solucionar el problema, vuelva a poner el análisis en cola sin cambios. Consulte Guía de TruSight Whole Genome Analysis Application (n.º de documento 200049931).</p>
El análisis falla en la cola	El análisis falló después de la cola	Si se vuelve a poner en cola el análisis, es posible que el experimento original se haya eliminado o archivado y ya no esté en la ubicación especificada para la ubicación de almacenamiento externa	Compruebe que el experimento original sigue estando en la ubicación de almacenamiento externo. Si está archivado, recupérela del archivo y vuelva a poner en cola el análisis.



Tipo de problema	Observación	Posible causa	Acción recomendada
Fallo del CC de la secuenciación	NO SUPERADO en el resumen de resultados del CC de secuenciación en el informe consolidado	"% Total =>P30" por debajo de la especificación analítica debido a una manipulación incorrecta de los consumibles de secuenciación (no se descongelan completamente o se invierten para mezclar después de descongelar)	Consulte Documentación de NovaSeq 6000Dx Instrument (documento #200010105). Tras solucionar el problema, la genoteca puede volver a agruparse y secuenciarse hasta una vez (debido al volumen).
El CC FASTQ falla con todas las muestras	FALLO en el resumen de resultados del CC FASTQ y el resumen de resultados del CC de la genoteca de muestras, con resultados de parámetros de CC de genoteca individuales notificados como ND, para todas las muestras en el informe consolidado con resumen de resultados del CC de secuenciación SUPERADO	Index Adapter Kit especificado durante la creación del experimento (Create Run) no está alineado con el que se utilizó durante la preparación de la genoteca	Vea las muestras para revisar la información de índice utilizada en el análisis en IRM. Si se necesita una corrección, consulte Requeue Analysis (Análisis de cola) en Guía de TruSight Whole Genome Analysis Application (n.º de documento 200049931).

Tipo de problema	Observación	Posible causa	Acción recomendada
El CC FASTQ falla para una o más muestras en ausencia de bajo rendimiento del experimento; rendimiento total no indexado (GB) $\geq 2800$ GB en S4 o $\geq 1000$ GB en S2	FALLO en el resumen de resultados del CC FASTQ y el resumen de resultados del CC de la genoteca de muestras, con resultados de parámetros de CC de genoteca individuales notificados como ND, para una o más pero no todas las muestras en el informe consolidado sin bajo rendimiento del experimento	Errores de uso durante la preparación o agrupación de genotecas	<p>Evalúe los volúmenes restantes en la placa de genoteca final (FLP) para confirmar el error de uso de las muestras omitidas de las genotecas agrupadas. El volumen permite al operador reagrupar y volver a secuenciar hasta una vez. Como alternativa, vuelva a poner en cola las muestras fallidas en el siguiente lote de preparación de genotecas y ejecute después de revisar las <a href="#">Instrucciones de uso, en la página 17</a>.</p> <p>Opcionalmente, evalúe los rendimientos de la genoteca individual en FLP mediante qPCR para <math>\geq 0,94</math> nM (suponiendo un tamaño de inserto de 450 pb) para descartar problemas relacionados con la preparación de la genoteca. Vuelva a poner en cola las muestras fallidas en el siguiente lote de preparación de genotecas y ejecute después de revisar las <a href="#">Instrucciones de uso, en la página 17</a>.</p> <p>No se recomienda agrupar genotecas entre lotes de preparación de genotecas debido a las fluctuaciones de lote a lote en los rendimientos, lo que puede resultar en un mayor porcentaje de CV y una mayor incidencia de fallo de la "cobertura autosómica promedio" (Average autosomal coverage).</p>

Tipo de problema	Observación	Posible causa	Acción recomendada
El CC FASTQ falla para algunas pero no todas las muestras con bajo rendimiento del experimento; rendimiento total no indexado (GB) bajo, <2800 GB en S4 o <1000 GB en S2	FALLO en el resumen de resultados del CC FASTQ y el resumen de resultados del CC de la genoteca de muestras, con resultados de parámetros de CC de genoteca individuales notificados como ND, para una o más pero no todas las muestras en el informe consolidado con bajo rendimiento del experimento	Puede indicar un problema relacionado con la secuenciación o la preparación de la genoteca	<p>Evalúe los rendimientos de la genoteca individual en FLP mediante qPCR para <math>\geq 0,94</math> nM (suponiendo un tamaño de inserto de 450 pb) para descartar problemas relacionados con la preparación de genotecas frente a las relacionadas con la secuenciación.</p> <p>Si se sospecha un problema de secuenciación, consulte Documentación de NovaSeq 6000Dx Instrument (documento #200010105). Tras solucionar el problema, las genotecas pueden reagruparse y volver a secuenciarse hasta una vez (debido al volumen limitado).</p> <p>Si se sospecha de un problema de preparación de la genoteca, revise <a href="#">Sugerencias y técnicas, en la página 14</a> e <a href="#">Instrucciones de uso, en la página 17</a> antes de repetir la preparación y secuenciación de la genoteca. Si hay fallos repetidos, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.</p>

Tipo de problema	Observación	Posible causa	Acción recomendada
El CC de la genoteca falla debido a una cobertura baja	FALLO en el resumen de resultados del CC de la genoteca de muestras para una o más muestras en el informe consolidado debido a la cobertura autosómica media, y/o porcentaje de autosoma con cobertura superior a 20X, y/o cobertura mitocondrial media sobre genoma que no supera la especificación analítica	Calidad de la muestra o problema(s) de preparación de la genoteca	<p>Realice una nueva cuantificación con controles de proceso para descartar problemas relacionados con la entrada de ADN.</p> <p>Revise los <a href="#">Sugerencias y técnicas</a>, en la <a href="#">página 14</a> e <a href="#">Instrucciones de uso</a>, en la <a href="#">página 17</a> antes de volver a poner en cola las muestras fallidas en el siguiente lote de preparación de genotecas y realice el experimento. Si se repiten los fallos con las mismas muestras, esto puede indicar un problema de calidad de las muestras.</p> <p>Si se observa un fallo de nuevo pero con muestras diferentes, esto puede indicar un problema relacionado con la preparación de la genoteca relacionado con el operador, el reactivo, el consumible o el equipo. Si el problema persiste, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.</p>

Tipo de problema	Observación	Posible causa	Acción recomendada
El CC de la genoteca falla debido al sesgo de GC	FALLO en el resumen de resultados del CC de la genoteca de muestras para una o más muestras en el informe consolidado debido a que la cobertura normalizada en los grupos de GC del 60 % al 79 % y/o la cobertura normalizada en los grupos de GC del 20 % al 39 % no superan las especificaciones analíticas	Excesivo arrastre de ELM o lavado omitido que provoca sesgo de GC en la cobertura	Revise los <a href="#">Sugerencias y técnicas</a> , en la <a href="#">página 14</a> e <a href="#">Instrucciones de uso</a> , en la <a href="#">página 17</a> antes de volver a poner en cola las muestras fallidas en el siguiente lote de preparación de genotecas y realice el experimento.
El CC de la genoteca falla por contaminación en una o más muestras del experimento, pero no en todas	FALLO en el resumen de resultados del CC de la genoteca de muestras para una o más muestras pero no todas en el informe consolidado debido a que la contaminación estimada de las muestras no supera la especificación analítica	Muestras contaminadas o no se cambiaron las puntas durante la preparación de la muestra o la genoteca	Revise los <a href="#">Sugerencias y técnicas</a> , en la <a href="#">página 14</a> e <a href="#">Instrucciones de uso</a> , en la <a href="#">página 17</a> antes de volver a poner en cola las muestras fallidas en el siguiente lote de preparación de genotecas y realice el experimento. Si se producen fallos repetidos en las mismas muestras, es posible que el ADN de la muestra esté contaminado.

Tipo de problema	Observación	Posible causa	Acción recomendada
El CC de la genoteca falla por contaminación de todas las muestras del experimento	Se indica FALLO en el resumen de resultados del CC de la genoteca de todas las muestras en el informe consolidado debido a que la contaminación estimada de las muestras no supera la especificación analítica	Reactivos contaminados o no se cambiaron las puntas durante la dilución de la muestra o la preparación de la genoteca	Revise los <a href="#">Sugerencias y técnicas, en la página 14</a> para evitar la contaminación. Vuelva a poner en cola las muestras fallidas en el siguiente lote de preparación de genotecas y procéselas utilizando diluciones de muestras nuevas y el kit de preparación de genotecas.
Resumen de resultados de ploidía ND	Resumen de resultados de ploidía notificados como ND (no determinado) en el informe consolidado	El sexo figuraba como desconocido durante la creación del experimento (Create Run)	Confirme que la “Provided sex chromosome ploidy” en el informe consolidado era “Desconocida” (“Unknown”). Se recomienda indicar el sexo como “Masculino” (Male) o “Femenino” (Female) en los datos de la muestra cuando se conozca durante la creación del experimento (Create Run).
		DRAGEN ha informado de un resultado de ploidía sexual distinto de XX o XY, como XO o XXY	Revise el resultado de “Estimación de la ploidía” (Ploidy estimation) en el informe consolidado de DRAGEN.

<b>Tipo de problema</b>	<b>Observación</b>	<b>Posible causa</b>	<b>Acción recomendada</b>
Resumen del resultado de ploidía DISCORDANTE	Resumen de resultados de ploidía notificados como DISCORDANTE en el informe consolidado	Posible problema de intercambio de muestras	Revise para confirmar que los datos de la muestra introducidos durante la creación del experimento (Create Run) son correctos. Si son incorrectos, vuelva a poner en cola el experimento con los cambios. Si son correcto, y se sospecha un problema de intercambio de muestras, se recomienda volver a poner en cola las muestras DISCORDANTES en el siguiente lote de preparación de la genoteca y ejecutar para evitar la notificación de resultados incorrectos. El software de muestras no indica fallo en las muestras con un resumen de resultados de ploidía DISCORDANTE.

## Referencias bibliográficas

1. Kashima T, Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet.* 2003;34(4):460-463. doi: 10.1038/ng1207.
2. Chen X, Sanchis-Juan A, French CE, et al. Spinal muscular atrophy diagnosis and carrier screening from genome sequencing data. *Genet Med.* 2020;22(5):945-953. doi: 10.1038/s41436-020-0754-0.
3. Prior TW. Perspectives and diagnostic considerations in spinal muscular atrophy. *Genet Med.* 2010;12(3):145-52. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181c5e713.
4. The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;526:68-74. doi: <https://doi.org/10.1038/nature15393>.
5. Halman A, Dolzhenko E, Oshlack A. Stripy: A graphical application for enhanced genotyping of pathogenic short tandem repeats in sequencing data. *Hum Mutat.* 2022;43(7):859-868. doi: 10.1002/humu.24382. Publicación electrónica: 21 de abril de 2022. PMID: 35395114; PMCID: PMC9541159.
6. Ibañez K, Polke J, Hagelstrom RT, Dolzhenko E, et al. Whole genome sequencing for the diagnosis of neurological repeat expansion disorders in the UK: a retrospective diagnostic accuracy and prospective clinical validation study. *Lancet Neurol.* 2022;21(3):234-245. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00462-2. PMID: 35182509; PMCID: PMC8850201.
7. Sequeiros J, Seneca S, Martindale J. Consensus and controversies in best practices for molecular genetic testing of *spinocerebellar ataxias*. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(11):1188-95. doi: 10.1038/ejhg.2010.10. Publicación electrónica: 24 de febrero de 2010. PMID: 20179748; PMCID: PMC2987480.
8. Perlman S. Hereditary Ataxia Overview. 28 de octubre de 1998 [actualizado el 16 de noviembre de 2023]. En: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., eds. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2024. PMID: 20301317.
9. Gijssels I, Van Mossevelde S, van der Zee J, et al. The C9orf72 repeat size correlates with onset age of disease, DNA methylation and transcriptional downregulation of the promoter. *Mol Psychiatry.* 2016;21(8):1112-24. doi: 10.1038/mp.2015.159. Publicación electrónica: 20 de octubre de 2015. PMID: 26481318; PMCID: PMC4960451.
10. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron.* 2011;72(2):245-56. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011. Publicación electrónica: 21 de septiembre de 2011. PMID: 21944778; PMCID: PMC3202986.
11. Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, et al. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science.* 2001;293(5531):864-7. doi: 10.1126/science.1062125. PMID: 11486088.
12. Lalioti MD, Scott HS, Antonarakis SE. What is expanded in progressive myoclonus epilepsy? *Nat Genet.* 1997;17(1):17. doi: 10.1038/ng0997-17. PMID: 9288090.
13. Joensuu T, Lehesjoki AE, Kopra O. Molecular background of EPM1-Unverricht-Lundborg disease. *Epilepsia.* 2008 ;49(4):557-63. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01422.x. Publicación electrónica: 19 de noviembre de 2007. PMID: 18028412.



14. Kamsteeg EJ, Kress W, Catalli C, et al. Best practice guidelines and recommendations on the molecular diagnosis of myotonic dystrophy types 1 and 2. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(12):1203-8. doi: 10.1038/ejhg.2012.108. Publicación electrónica: 30 de mayo de 2012. PMID: 22643181; PMCID: PMC3499739.
15. Biancalana V, Glaeser D, McQuaid S, Steinbach P. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(4):417-25. doi: 10.1038/ejhg.2014.185. Publicación electrónica: 17 de septiembre de 2014. PMID: 25227148; PMCID: PMC4666582.
16. Dolzhenko E, Deshpande V, Schlesinger F, et al. ExpansionHunter: a sequence-graph-based tool to analyze variation in short tandem repeat regions. *Bioinformatics.* 2019;35(22):4754-4756. doi: 10.1093/bioinformatics/btz431. PMID: 31134279; PMCID: PMC6853681.
17. van Kuilenburg ABP, Tarailo-Graovac M, Richmond PA, et al. Glutaminase Deficiency Caused by Short Tandem Repeat Expansion in GLS. *N Engl J Med.* 2019;380(15):1433-1441. doi: 10.1056/NEJMoa1806627. PMID: 30970188; PMCID: PMC8819703.
18. Losekoot M, van Belzen MJ, Seneca S, et al; European Molecular Genetic Quality Network (EMQN). EMQN/CMGS best practice guidelines for the molecular genetic testing of Huntington disease. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(5):480-6. doi: 10.1038/ejhg.2012.200. Publicación electrónica: 19 de septiembre de 2012. PMID: 22990145; PMCID: PMC3641377.
19. Holmes SE, O'Hearn E, Rosenblatt A, et al. A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nat Genet.* 2001;29(4):377-8. doi: 10.1038/ng760. Erratas en: *Nat Genet* 2002 Jan;30(1):123. PMID: 11694876.
20. Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, et al. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum Genet.* 2011;89(1):121-30. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.05.015. Publicación electrónica: 16 de junio de 2011. PMID: 21683323; PMCID: PMC3135815.
21. García-Murias M, Quintáns B, Arias M, et al. 'Costa da Morte' ataxia is spinocerebellar ataxia 36: clinical and genetic characterization. *Brain.* 2012;135(Pt 5):1423-35. doi: 10.1093/brain/aws069. Publicación electrónica: 3 de abril de 2012. PMID: 22492559; PMCID: PMC3338928.
22. Ishiura H, Shibata S, Yoshimura J, et al. Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. *Nat Genet.* 2019;51(8):1222-1232. doi: 10.1038/s41588-019-0458-z. Publicación electrónica: 22 de julio de 2019. PMID: 31332380.
23. Sone J, Mitsuhashi S, Fujita A, et al. Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease. *Nat Genet.* 2019;51(8):1215-1221. doi: 10.1038/s41588-019-0459-y. Publicación electrónica: 22 de julio de 2019. PMID: 31332381.
24. Amiel J, Laudier B, Attié-Bitach T, et al. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet.* 2003;33(4):459-61. doi: 10.1038/ng1130. Publicación electrónica: 17 de marzo de 2003. PMID: 12640453.

# Apéndice A

## Juego de índices S4 1

ID de pocillo de placa de índices	Nombre de índice	Bases i7	Bases i5
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGCACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAACTGAA
F01	UDP0042	GTCTAATGGC	AGTGGTCAGG
G01	UDP0043	CCATCTCGCC	TTCTATGGTT
H01	UDP0044	CTGCGAGCCA	AATCCGGCCA
A02	UDP0065	TAATGTGTCT	GTAAGGCATA
B02	UDP0066	ATACCAACGC	AATTGCTGCG
C02	UDP0067	AGGATGTGCT	TTACAATTCC
D02	UDP0068	CACGGAACAA	AACCTAGCAC
E02	UDP0069	TGGAGTACTT	TCTGTGTGGA
F02	UDP0070	GTATTGACGT	GGAATTCCAA
G02	UDP0071	CTTGTACACC	AAGCGCGCTT
H02	UDP0072	ACACAGGTGG	TGAGCGTTGT

## Conjunto de índices S4 2

ID de pocillo de placa de índices	Nombre de índice	Bases i7	Bases i5
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT

ID de pocillo de placa de índices	Nombre de índice	Bases i7	Bases i5
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC
G03	UDP0087	CCTCTACATG	GATACCTCCT
H03	UDP0088	GGAGCGTGTA	ATCCGTAAGT
A04	UDP0089	GTCCGTAAGC	CGTGTATCTT
B04	UDP0090	ACTTCAAGCG	GAACCATGAA
C04	UDP0091	TCAGAAGGCG	GGCCATCATA
D04	UDP0092	GCGTTGGTAT	ACATACTTCC
E04	UDP0093	ACATATCCAG	TATGTGCAAT
F04	UDP0094	TCATAGATTG	GATTAAGGTG
G04	UDP0095	GTATTCCACC	ATGTAGACAA
H04	UDP0096	CCTCCGTCCA	CACATCGGTG

## Juego de índices S2 1

ID de pocillo de placa de índices	Nombre de índice	Bases i7	Bases i5
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGCACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAACTGAA
F01	UDP0042	GTCTAATGGC	AGTGGTCAGG

## Conjunto de índices S2 2

ID de pocillo de placa de índices	Nombre de índice	Bases i7	Bases i5
A02	UDP0065	TAATGTGTCT	GTAAGGCATA
B02	UDP0066	ATACCAACGC	AATTGCTGCG
C02	UDP0067	AGGATGTGCT	TTACAATTCC
D02	UDP0068	CACGGAACAA	AACCTAGCAC

ID de pocillo de placa de índices	Nombre de índice	Bases i7	Bases i5
E02	UDP0069	TGGAGTACTT	TCTGTGTGGA
F02	UDP0070	GTATTGACGT	GGAATTCCAA

## Conjunto de índices S2 3

ID de pocillo de placa de índices	Nombre de índice	Bases i7	Bases i5
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGCGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC

## Juego de índices S2 4

ID de pocillo de placa de índices	Nombre de índice	Bases i7	Bases i5
A04	UDP0089	GTCCGTAAGC	CGTGTATCTT
B04	UDP0090	ACTTCAAGCG	GAACCATGAA
C04	UDP0091	TCAGAAGGCG	GGCCATCATA
D04	UDP0092	GCGTTGGTAT	ACATACTTCC
E04	UDP0093	ACATATCCAG	TATGTGCAAT
F04	UDP0094	TCATAGATTG	GATTAAGGTG

## Apéndice B

Cálculos adicionales para la opción 1: entrada de ADN de 280 ng para métodos de cuantificación de amplio rango Qubit y Quant

### **Cálculo de los límites de concentración para la concentración de reserva de ADN de 11,2 a 154,0 ng/μl:**

La concentración mínima se basa en una entrada de ADN de 280,0 ng/volumen de 25,0 μl = 11,2 ng/μl.

Basándose en un volumen mínimo de pipeteado de 2,0 μl, la concentración máxima es de  $280 \text{ ng} \times 1,1$  (10 % de excedente) / 2,0 μl = 154,0 ng/μl, en un volumen total de 27,5 μl.

### **Ejemplos de cálculos con entrada de ADN de 280,0 ng**

Ejemplo trabajado para la concentración de material de ADN = 95,0 ng/μl:

- Volumen de reserva de ADN (μl) =  $280,0 \text{ ng} \times 1,1 / 95,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$ , redondeado a 3,24 μl para un pipeteado preciso con P-10.
- El volumen total de ADN diluido se fija en 27,5 μl.
- Volumen de RSB (μl) =  $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$ , redondeado a 24,3 μl para un pipeteado preciso con P-200.

Ejemplo trabajado para la concentración de material de ADN = 308,0 ng/μl:

- El volumen de reserva de ADN (μl) se fija en 2,0 μl
- Volumen total de ADN diluido (μl) =  $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l} / 11,2 \text{ ng}/\mu\text{l} = 55,0 \mu\text{l}$
- Volumen de RSB (μl) =  $55,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 53,0 \mu\text{l}$

Cálculos adicionales para la opción 2: entrada de ADN de 350 ng para el método de cuantificación de sensibilidad ultra alta Accuclear

### **Cálculo de los límites de concentración para las concentraciones de reserva de ADN de 14,0 a 192,5 ng/μl:**

La concentración mínima se basa en una entrada de ADN de 350,0 ng/volumen de 25,0 μl = 14,0 ng/μl.

Basándose en un volumen mínimo de pipeteado de 2,0 μl, la concentración máxima es de  $350 \text{ ng} \times 1,1$  (10 % de excedente) / 2,0 μl = 192,5 ng/μl.

### **Ejemplos de cálculos con entrada de ADN de 350,0 ng**

Ejemplo trabajado para la concentración de material de ADN = 118,75 ng/μl:

- Volumen de reserva de ADN (μl) =  $350,0 \text{ ng} \times 1,1 / 118,75 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$ , redondeado a 3,24 μl para un pipeteado preciso con P-10.
- El volumen total de ADN diluido se fija en 27,5 μl.

- Volumen de RSB ( $\mu\text{l}$ ) =  $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$ , redondeado a  $24,3 \mu\text{l}$  para un pipeteado preciso con P-200.

Ejemplo trabajado para la concentración de material de ADN =  $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ :

- El volumen de reserva de ADN ( $\mu\text{l}$ ) se fija en  $2,0 \mu\text{l}$
- Volumen total de ADN diluido ( $\mu\text{l}$ ) =  $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l} / 14,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 44,0 \mu\text{l}$
- Volumen de RSB ( $\mu\text{l}$ ) =  $44,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 42,0 \mu\text{l}$

## Historial de revisiones

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de documento 200050132 v00.1	Mayo de 2024	Volumen de entrada corregido para el método de cuantificación Accuclear de ultra alta sensibilidad.
N.º de documento 200050132 v00	Abril de 2024	Publicación inicial.

## Instrucciones de uso

### 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).

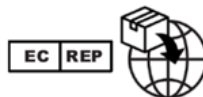
© 2024 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

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](http://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](http://support.illumina.com) en la ficha *Documentation* (Documentación) del kit.