

Prospecto de TruSight Cystic Fibrosis

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

N.º de catálogo 20036925: Entre uno y cuatro experimentos, hasta 96 muestras por kit

Descripción general del producto

TruSight Cystic Fibrosis Library Prep™ es un kit de preparación de bibliotecas que admite el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística TruSight (TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay™) y el ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística TruSight (TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay™).

Uso previsto del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística TruSight

El ensayo de 139 variantes de fibrosis quística TruSight (antes conocido como ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina) es un sistema cualitativo de diagnóstico *in vitro* utilizado para detectar de forma simultánea 139 mutaciones y variantes de interés clínico que provocan la enfermedad de la fibrosis quística del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) en el ADN genómico aislado de las muestras de sangre humana total periférica. Las variantes incluyen las recomendadas en 2004 por el American College of Medical Genetics (ACMG)¹ y las recomendadas en 2011 por el American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG).² La prueba está diseñada para el cribado de portadores en adultos en edad reproductiva; en pruebas de diagnóstico de confirmación de recién nacidos y niños, y como prueba inicial para ayudar en el diagnóstico de personas con posibles síntomas de fibrosis quística. Los resultados de esta prueba pueden interpretarlos tanto un genetista molecular clínico acreditado como un homólogo y deben utilizarlos junto con el resto de la información clínica y de laboratorio disponible.

Esta prueba no está indicada para el cribado de recién nacidos, pruebas diagnósticas fetales, pruebas previas a implantaciones o fines de diagnóstico independientes.

La prueba está diseñada para su uso con el instrumento MiSeqDx de Illumina.

Uso previsto del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística TruSight

El ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística TruSight (antes, ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina) es un sistema de diagnóstico *in vitro* de secuenciación selectiva que resecuencia las regiones codificantes de proteínas y los límites de intrones y exones del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) en el ADN genómico aislado a partir de muestras de sangre completa humana periférica obtenidas de K₂EDTA. La prueba detecta variantes de nucleótido único, así como pequeñas inserciones y deleciones en la región secuenciada, e identifica, asimismo, dos mutaciones intrónicas profundas y dos deleciones de gran tamaño. La prueba está diseñada para su uso con el instrumento MiSeqDx de Illumina.

La prueba se ha diseñado para utilizarse como ayuda en el diagnóstico de personas con síntomas de fibrosis quística (FQ). Este ensayo resulta más apropiado cuando el paciente presenta una fibrosis quística atípica o no clásica, o cuando otros paneles de mutaciones no han podido identificar las mutaciones causantes. Los resultados de la prueba los debe interpretar un especialista certificado en genética molecular clínica o un homólogo, y se deben utilizar junto con otra información disponible como, por ejemplo, los síntomas clínicos, otras pruebas diagnósticas y los antecedentes familiares.

Esta prueba no está indicada para fines de diagnóstico independiente, pruebas diagnósticas en fetos, pruebas previas a implantaciones, el cribado de portadores, el cribado de recién nacidos o el cribado de la población.

Contexto de fibrosis quística

Descripción clínica

La fibrosis quística (FQ) es una de las enfermedades genéticas más comunes del mundo occidental y el trastorno autosómico recesivo más frecuente que supone una amenaza para la vida entre la población blanca no hispánica.³⁻⁷ La FQ afecta a la viscosidad de las secreciones mucosas y al epitelio de las vías respiratorias, el páncreas, los intestinos, el sistema hepatobiliar, el tracto genital masculino y las glándulas sudoríparas, y provoca enfermedades multisistémicas complejas en varios órganos.⁴⁻⁶ Cabe destacar que los pulmones son el principal sistema anatómico asociado con la morbilidad y mortalidad.⁸ En muchos casos, el deterioro nutricional presagia la evolución de la enfermedad pulmonar de la FQ. Un enfoque clave de los esfuerzos intervencionistas actuales es el diagnóstico precoz mediante el cribado de los recién nacidos,⁷ porque permite facilitar un acceso a tiempo a los servicios médicos fundamentales y garantizar el mejor resultado posible para las personas que padecen esta enfermedad.^{4,7} Aunque existen diferencias en la supervivencia según el sexo (se registra una mediana correspondiente a la supervivencia superior en los hombres que en las mujeres), el valor de la mediana correspondiente a la supervivencia es de 38,3 años en EE. UU.⁸

Variantes e incidencia de CFTR

El gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) identificado en 1989 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7 y contiene 27 exones de codificación repartidos en 230 kb.⁴ Un ARNm de 6,5 kb producido por el alelo normal codifica la CFTR, una proteína integral de membrana de 1490 aminoácidos que funciona como un canal de cloruro regulado en las células epiteliales de varios órganos.^{4,5} En la actualidad, hay más de 1900 variantes de CFTR descritas, y la mayoría de ellas son mutaciones puntuales.⁹ La variante más habitual de la CFTR es el alelo F508del,⁵ que representa casi un 70 % de todas las variantes de la CFTR.³ No obstante, a menudo otras variantes habituales de la CFTR suelen conllevar el fenotipo de la fibrosis quística y otras enfermedades relacionadas con la CFTR.³⁻⁵

La fibrosis quística tiene una incidencia estimada de uno entre 2000 a 4000 nacidos vivos y una prevalencia de aproximadamente 30 000 personas en la población estadounidense.⁴ Se da en todo tipo de etnias y razas con diferentes frecuencias: una de cada 3000 personas caucásicas; una de cada 9200 personas hispanoamericanas; una de cada 10 900 personas nativas americanas; una de cada 15 000 personas afroamericanas; y una de cada 31 000 personas asiáticoamericanas.^{4,6} En la [Tabla 1](#) se proporcionan los cálculos actuales de frecuencia de portadores de la mutación de CFTR por origen étnico en los EE. UU. basados en una cohorte de 364 890 individuos sometidos a pruebas para determinar portadores sin antecedentes familiares de fibrosis quística.

Tabla 1 Frecuencia general de portadores de mutación de fibrosis quística en distintos grupos étnicos de EE. UU.¹⁰

Grupo étnico	Frecuencia de portadores observada
Afroamericano	Uno entre 84
Judío asquenazí	Uno entre 29
Asiática	Uno entre 242
Blanco	Uno entre 28
Hispano	Uno entre 59
Judío	Uno entre 32
De Oriente Medio	Uno entre 91
Nativo americano	Uno entre 70
Sudasiático	Uno entre 118
Otro origen étnico	Uno entre 111
Otro origen étnico: > 1 origen étnico	Uno entre 34
Otro origen étnico: Mitad afroamericano	Uno entre 56
Otro origen étnico: Mitad caucásico	Uno entre 32
Otro origen étnico: Mitad hispano	Uno entre 51
No se indica	Uno entre 37
Todos los individuos	Uno entre 38

Resumen y explicación del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística

Descripción general del proyecto CFTR2

El proyecto CFTR2 es una iniciativa internacional dirigida por un equipo de investigadores y médicos y financiada por el instituto estadounidense de sanidad (National Institute of Health) y la fundación para la fibrosis quística de EE. UU. (U.S. Cystic Fibrosis Foundation).^{11,12} Este proyecto se ha concebido para proporcionar información clínica y funcional detallada y revisada por expertos acerca de las variantes de CFTR. Para validar clínicamente todas las variantes de fibrosis quística con frecuencias de alelos de un mínimo del 0,01 %, 25 registros de fibrosis quística y clínicas de todo el mundo¹³ aunaron recursos con el fin de emparejar información clínica de más de 39 000 pacientes con fibrosis quística con, aproximadamente, 1900 variantes de fibrosis quística que se habían registrado con el paso de los años en la base de datos del CFTR1 en el hospital de pediatría Hospital for Sick Children de Toronto (Canadá).^{11,13} Se analizaron las características clínicas, tales como la concentración de cloruro en sudor, la función pulmonar (predicción de FEV1%) y el estado pancreático, junto con la información de genotipo de CFTR. El enfoque sistemático del análisis simultáneo de estas variantes desde perspectivas clínicas, funcionales y genéticas definió 134 variantes únicas causantes de la fibrosis quística en 129 posiciones genómicas únicas (ya que, en el caso de cinco posiciones, aparecen dos cambios de nucleótidos en la misma posición) que se encuentran en la base de datos del CFTR2 (desde agosto de 2013). Se espera que el uso de un panel que abarque todas estas variantes incluya al 95,4 % de los alelos que causan la fibrosis quística y permita aumentar la identificación de parejas en riesgo mediante la detección de ambos alelos de un 72 % a, aproximadamente, un 91 % con el panel de 23 variantes recomendado por la ACMG.

Variantes de CFTR del panel

Las variantes que se notificaron en el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística se seleccionaron específicamente porque representan todo el conjunto de variantes clínicamente validadas clasificadas como causantes de la fibrosis quística en la base de datos del CFTR2 de la universidad Johns Hopkins University, un producto de la iniciativa CFTR2 (Clinical and Functional Translation of CFTR).

El ensayo realiza pruebas de lo siguiente: 134 variantes causantes de la fibrosis quística, una variante de panel recomendada por la institución estadounidense de genética médica (ACMG) (R117H, clasificada como mutación de consecuencia clínica variable [MVCC] según CFTR2), una variante de modificación descrita de forma secundaria (Poli-TG/Poli-T) y tres variantes benignas descritas de forma secundaria (I506V, I507V y F508C)¹⁴ para un total de 139 variantes descritas.

Las 134 variantes causantes de la fibrosis quística corresponden a 129 variantes causantes de la fibrosis quística de la base de datos del CFTR2. La base de datos del CFTR2 incluye cinco variantes causantes de la fibrosis quística que pueden sufrir el mismo cambio en el nivel proteico a partir de dos cambios de nucleótidos diferentes como, por ejemplo, S466X(C>A) y S466X(C>G). Estas cinco variantes se enumeran de acuerdo con el codón de aminoácidos de la base de datos del CFTR2 (por ejemplo, S466X), mientras que el ensayo especifica cada una de las variantes como, por ejemplo, S466X(C>A) y S466X(C>G). En la **Tabla 2** se puede consultar la lista de 139 variantes descrita en el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística. **Negrita=ACMG-23;** **cursiva=descritas de forma secundaria.**

Tabla 2 Resumen de las variantes del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística

[Las variantes se enumeran por orden de coordenadas genómicas; el cambio en el nivel de los nucleótidos asociados para cada variante se muestra entre paréntesis.]

M1V (c.1A>G)	T338I (c.1013C>T)	R553X (c.1657C>T)	3272-26A>G (c.3140-26A>G)
CFTRdele2,3 (c.54-5940_273+10250del21kb)	S341P (c.1021T>C)	A559T (c.1675G>A)	L1065P (c.3194T>C)
Q39X (c.115C>T)	1154insTC (c.1022_1023insTC)	R560T (c.1679G>C)	R1066C (c.3196C>T)
E60X (c.178G>T)	R347H (c.1040G>A)	R560K (c.1679G>A)	R1066H (c.3197G>A)
P67L (c.200C>T)	R347P (c.1040G>C)	1811+1,6kbA>G (c.1679+1,6kbA>G)	L1077P (c.3230T>C)
R75X (c.223C>T)	R352Q (c.1055G>A)	1812-1G>A (c.1680-1G>A)	W1089X (c.3266G>A)
G85E (c.254G>A)	1213delT (c.1081delT)	E585X (c.1753G>T)	Y1092X(C>A) (c.3276C>A)
394delTT (c.262_263delTT)	1248+1G>A (c.1116+1G>A)	1898+1G>A (c.1766+1G>A)	Y1092X(C>G) (c.3276C>G)
405+1G>A (c.273+1G>A)	1259insA (c.1127_1128insA)	1898+3A>G (c.1766+3A>G)	M1101K (c.3302T>A)
406-1G>A (c.274-1G>A)	W401X(c.1202G>A)	2143delT (c.2012delT)	E1104X (c.3310G>T)
E92X (c.274G>T)	W401X(c.1203G>A)	2183AA >G (c.2051_2052delAAinsG)	R1158X (c.3472C>T)
E92K (c.274G>A)	1341+1G>A (c.1209+1G>A)	2184delA (c.2052delA)	R1162X (c.3484C>T)
Q98X (c.292C>T)	1461ins4 (c.1329_1330insAGAT)	2184insA (c.2052_2053insA)	3659delC (c.3528delC)
457TAT>G (c.325_327delTATinsG)	A455E (c.1364C>A)	R709X (c.2125C>T)	S1196X (c.3587C>G)
D110H (c.328G>C)	1525-1G>A (c.1393-1G>A)	K710X (c.2128A>T)	W1204X (c.3611G>A)
R117C (c.349C>T)	S466X (C>A) (c.1397C>A)	2307insA (c.2175_2176insA)	W1204X (c.3612G>A)
R117H (c.350G>A)	S466X (C>G) (c.1397C>G)	L732X (c.2195T>G)	3791delC (c.3659delC)
Y122X (c.366T>A)	L467P (c.1400T>C)	2347delG (c.2215delG)	3849+10kbC>T (c.3717+12191C>T)
574delA (c.442delA)	1548delG (c.1418delG) [†]	R764X (c.2290C>T)	G1244E (c.3731G>A)
621+1G>T (c.489+1G>T)	S489X (c.1466C>A)	2585delT (c.2453delT)	3876delA (c.3744delA)
663delT (c.531delT)	S492F (c.1475C>T)	E822X (c.2464G>T)	S1251N (c.3752G>A)

G178R (c.532G>A)	Q493X (c.1477C>T)	2622+1G>A (c.2490+1G>A)	3905insT (c.3773_3774insT)
711+1G>T (c.579+1G>T)	I507del (c.1519_1521delATC)	E831X (c.2491G>T)	W1282X (c.3846G>A)
711+3A>G (c.579+3A>G)	F508del (c.1521_1523delCTT)	W846X (c.2537G>A)	4005+1G>A (c.3873+1G>A)
711+5G>A (c.579+5G>A)	1677delTA (c.1545_1546delTA)	R851X (c.2551C>T)	4016insT (c.3884_3885insT)
712-1G>T (c.580-1G>T)	V520F (c.1558G>T)	2711delT (c.2583delT)	N1303K (c.3909C>G)
H199Y (c.595C>T)	Q525X (c.1573C>T) [†]	2789+5G>A (c.2657+5G>A)	Q1313X (c.3937C>T)
P205S (c.613C>T)	1717-8G>A (c.1585-8G>A)	Q890X (c.2668C>T)	4209TGTT>AA (c.4077_4080delTGTTinsAA)
L206W (c.617T>G)	1717-1G>A (c.1585-1G>A)	L927P (c.2780T>C)	CFTRdele22,23 (c.3964-78_4242+577del)
Q220X (c.658C>T)	G542X (c.1624G>T)	S945L (c.2834C>T)	4382delA (c.4251delA)
852del22 (c.720_741delAGGGAGAATGATGATGAAGTAC)	S549R(c.1645A>C)	3007delG (c.2875delG)	<i>Poli-TG/Poli-T</i>
1078delT (c.948delT)	S549N (c.1646G>A)	G970R (c.2908G>C)	<i>I506V (c.1516A>G)</i>
G330X (c.988G>T)	S549R (c.1647T>G)	3120G>A (c.2988G>A)	<i>I507V (c.1519A>G)</i>
R334W (c.1000C>T)	G551D (c.1652G>A)	3120+1G>A (c.2988+1G>A)	<i>F508C (c.1523T>G)</i>
I336K (c.1007T>A)	Q552X (c.1654C>T)	3121-1G>A (c.2989-1G>A)	

[†] Clasificado en la base de datos de CFTR²¹² como una variante causante de la fibrosis quística, mientras que el artículo de Sosnay¹³ clasifica la variante como indeterminada. La clasificación de la base de datos es más reciente y refleja la prueba funcional completa que no estaba disponible en el momento de la publicación de Sosnay.

Resumen y explicación del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística

Diseño del ensayo

Todas las regiones de codificación de proteínas en el gen CFTR, incluida la secuencia intrónica adyacente de 10 nt, se detectan en todos los exones excepto en tres (los exones 7, 10 y 20). En el caso de los exones 7 y 10, solo se incluye la secuencia intrónica adyacente de 5 nt en el extremo 5' del exón para evitar inserciones y deleciones homopoliméricas proximales. En el caso del exón 20, se incluye la secuencia intrónica adyacente de 30 nt en el extremo 5' del exón para posibilitar la detección de la mutación 3272-26A>G. Además, el ensayo detecta, aproximadamente, 100 nt de secuencia adyacente en las regiones no traducidas 5' y 3', dos mutaciones intrónicas profundas (1811+1.6kbA>G y 3489+10kbC>T), dos deleciones de gran tamaño (CFTRdele2,3 y CFTRdele22,23) y la región Poli-TG/Poli-T. La cobertura total del ensayo se muestra en las posiciones de las coordenadas genómicas que se indican en la [Tabla 3](#).



NOTA:

Existen limitaciones en cuanto a la detección de deleciones en ubicaciones genómicas específicas de las regiones secuenciadas de este ensayo (consulte [Limitaciones del procedimiento del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística en la página 9](#)).

Tabla 3 Cobertura de coordenadas genómicas del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística

	Inicio de la coordenada genómica hg19 (cromosoma 7)	Detención de la coordenada genómica hg19 (cromosoma 7)	Longitud (pares de bases)
CFTR_Exon 1	117120041	117120211	171
CFTR_Exon 2	117144297	117144427	131
CFTR_Exon 3	117149078	117149206	129
CFTR_Exon 4	117170943	117171178	236
CFTR_Exon 5	117174320	117174429	110
CFTR_Exon 6	117175292	117175475	184
CFTR_Exon 7 [^]	117176597	117176737	141
CFTR_Exon 8	117180144	117180410	267
CFTR_Exon 9	117182060	117182172	113
CFTR_Exon 10 [^]	117188690	117188887	198
CFTR_Exon 11	117199508	117199719	212
CFTR_Exon 12	117227783	117227897	115
CFTR_Intron 12 [*]	117229516	117229526	11
CFTR_Exon 13	117230397	117230503	107
CFTR_Exon 14	117231978	117232721	744
CFTR_Exon 15	117234974	117235122	149
CFTR_Exon 16	117242870	117242927	58
CFTR_Exon 17	117243576	117243846	271
CFTR_Exon 18	117246718	117246817	100
CFTR_Exon 19	117250563	117250733	171
CFTR_Exon 20 [#]	117251605	117251872	268
CFTR_Exon 21	117254657	117254777	121
CFTR_Exon 22	117267566	117267834	269
CFTR_Intron 22 [*]	117280010	117280020	11
CFTR_Exon 23	117282482	117282657	176
CFTR_Exon 24	117292886	117292995	110
CFTR_Exon 25	117304732	117304924	193
CFTR_Exon 26	117305503	117305628	126
CFTR_Exon 27	117306952	117307262	311
Total de bases			5203^{**}

[^] En el caso de los exones 7 y 10, solo se incluye la secuencia intrónica adyacente de 5 nt en posición ascendente respecto del exón para evitar las elongaciones homopoliméricas en estas regiones. En el caso del exón 10, esta es la región Poli-T/Poli-TG del intrón 9. Esta región se trata de forma especial e independiente.

^{*} En el caso de las mutaciones intrónicas profundas, también se incluyen cinco nucleótidos adyacentes a la SNV en cada lado.

[#] En el caso del exón 20, la secuencia intrónica adyacente de 30 nt se incluye en el extremo 5' del exón para permitir la detección de la mutación 3272-26A>G.

^{**} Con las dos deleciones de gran tamaño y las regiones Poli-TG/Poli-T, las posiciones/regiones totales son 5206.

Principios de procedimiento

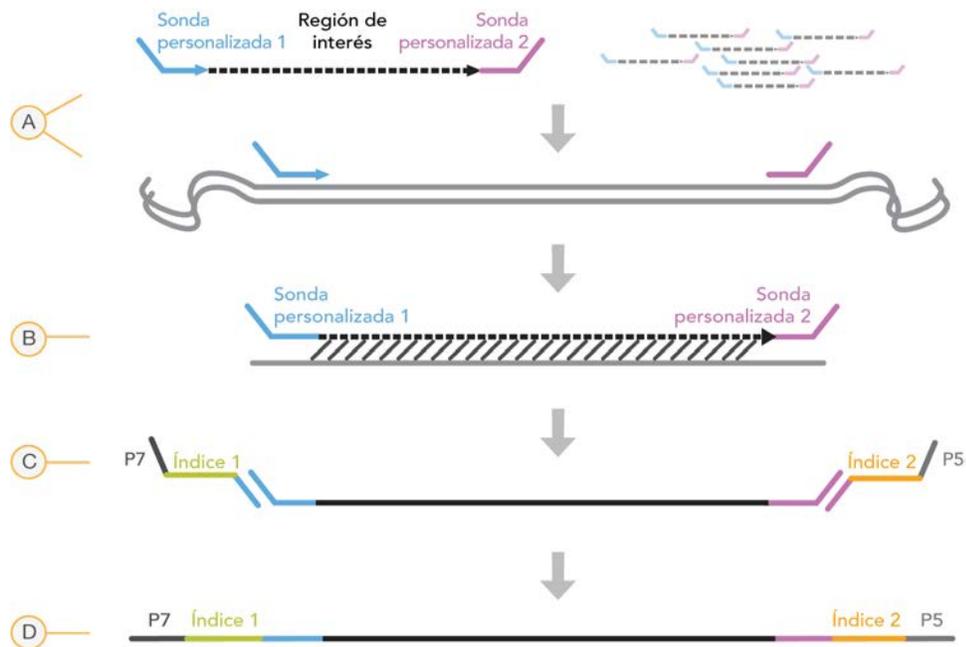
TruSight Cystic Fibrosis Library Prep está concebido para preparar manualmente las bibliotecas que se utilizan en la secuenciación de ADN de muestras de sangre completa periférica. La preparación de bibliotecas consta de cuatro pasos clave: hibridación, extensión-ligadura, amplificación PCR y normalización de bibliotecas.



NOTA

Los procedimientos de preparación de bibliotecas son los mismos para el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística y para el ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística.

Preparación de bibliotecas



- A **Hibridación:** El primer paso, la hibridación, hibrida un grupo de oligonucleótidos ascendentes y descendentes específico del gen de fibrosis quística para el ADN genómico de entrada. Al final de este proceso, un procedimiento de lavado de tres pasos con un filtro con capacidad de selección de tamaño elimina los oligonucleótidos sin ligar del ADN genómico.
- B **Extensión-ligadura:** El segundo paso, la extensión-ligadura, conecta los oligonucleótidos ascendentes y descendentes hibridados. Una polimerasa del ADN se extiende desde los oligonucleótidos ascendentes hasta la región objetivo, seguida de la ligadura hasta el extremo 5' del oligonucleótido descendente mediante el uso de una ligasa de ADN. El resultado es la formación de productos que contienen oligonucleótidos específicos de la fibrosis quística flanqueados por las secuencias requeridas para la amplificación.
- C **Amplificación PCR:** el tercer paso, la amplificación PCR, amplifica los productos de extensión-ligadura con cebadores que añaden secuencias de índice para el multiplexado de muestras, así como los adaptadores comunes necesarios para la generación de grupos en MiSeqDx. Al final de este proceso, un procedimiento de limpieza mediante PCR purifica los productos de PCR (denominado biblioteca).

- D **Normalización de bibliotecas:** el paso final, la Normalización de bibliotecas, normaliza la cantidad de cada biblioteca para garantizar una representación de bibliotecas más equitativa en la biblioteca agrupada definitiva. Al final de este proceso, la biblioteca agrupada se carga en MiSeqDx para proceder con la secuenciación mediante el uso de la química de SBS.

Secuenciación

La química de SBS utiliza un método basado en terminadores reversibles para detectar bases de nucleótidos únicos en la incorporación a las cadenas de ADN en crecimiento. Durante cada ciclo de secuenciación, se añade un desoxinucleótido trifosfato (dNTP) único marcado con fluorescencia a la cadena de ácido nucleico. El nucleótido marcado sirve como terminador para la polimerización, de modo que tras cada incorporación de dNTP, el colorante fluorescente se digitaliza para identificar la base y, a continuación, la segmentación enzimática para permitir la incorporación del nucleótido siguiente. Puesto que los cuatro dNTP ligados al terminador reversible (A, G, T, C) están presentes como moléculas únicas, la competencia natural de moléculas separadas minimiza la tendencia a la incorporación. Las llamadas de base se realizan directamente a partir de las mediciones de intensidad de señal durante cada ciclo de secuenciación. El resultado es la secuenciación base por base.

Análisis de datos

El primer paso del análisis de datos se denomina análisis primario. Este proceso se lleva a cabo con el software Real Time Analysis (RTA, Análisis en tiempo real) y genera llamada de bases y puntuaciones de calidad. En el paso siguiente, denominado análisis secundario, se procesan las llamadas de bases generadas durante el análisis primario con el fin de generar información de cada muestra. El análisis secundario se lleva a cabo con el software Local Run Manager, e incluye demultiplexado, generación de un archivo FASTQ, alineación, llamadas de variantes y generación de archivos VCF que contienen información de las variantes encontradas en posiciones concretas del genoma de referencia.

- ▶ **Demultiplexado:** Si el experimento contiene varias muestras y tiene lecturas de índice, este es el primer paso del análisis secundario. El demultiplexado separa datos de las muestras agrupadas en función de los índices de secuencia únicos que se añadieron durante el paso de amplificación PCR.
- ▶ **Generación de archivos FASTQ:** Tras el demultiplexado, Local Run Manager genera archivos intermedios en el formato FASTQ, que es un formato de texto empleado para representar secuencias. Los archivos FASTQ contienen las lecturas de cada muestra y las puntuaciones de calidad, excepto las lecturas de los grupos que no hayan superado el filtro.
- ▶ **Alineación:** La alineación compara secuencias con la referencia para identificar una relación entre las secuencias y asigna una puntuación en función de las regiones de similitud. Las lecturas alineadas se escriben en archivos con formato BAM. En el caso del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística y del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística, un algoritmo de Smith-Waterman realiza alineaciones de secuencias locales para determinar regiones similares entre dos secuencias.
- ▶ **Llamadas de variantes:** Este paso registra las variantes de nucleótido único (SNV), las inserciones y deleciones, y otras variantes estructurales en un archivo de texto normalizado llamado TruSightCF139VariantAssay.txt para el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística o TruSightCFClinicalSequencingAssay.txt para el ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística.

Para obtener más información acerca del flujo de trabajo de análisis, consulte las guías del software de análisis que acompaña al MiSeqDx. Para obtener la *guía de flujo de trabajo del módulo de análisis de 139 variantes de fibrosis quística de Local Run Manager 2.0*, consulte el n.º de documento 1000000100945. Para ver la *guía de flujo de trabajo del módulo de análisis de secuenciación clínica de fibrosis quística 2.0 de Local Run Manager*, consulte el documento n.º 1000000100946.

Limitaciones del procedimiento del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística

- ▶ Para uso diagnóstico *in vitro*.
- ▶ Los resultados obtenidos con el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística se deben utilizar e interpretar en el marco de una evaluación clínica completa.
- ▶ El ensayo se ha diseñado para la identificación de un subconjunto específico de variantes conocidas en el gen de la CFTR y no incluye todas las variantes identificadas en él. Concretamente, el ensayo solo identifica los cambios en el nivel de los aminoácidos si estos están asociados con los cambios de nucleótido tal y como se muestran en la [Tabla 2](#). Mientras que otros cambios en el nivel de los nucleótidos pueden provocar los mismos cambios en el nivel de los aminoácidos, estos cambios no los identifica el ensayo. Por lo tanto, la no identificación de una variante no garantiza que no existan otras variantes de la CFTR en las muestras que se estén analizando.
- ▶ Las variantes identificadas con este ensayo varían en frecuencia en función de las distintas poblaciones.
- ▶ Del mismo modo que con cualquier ensayo basado en hibridación, los polimorfismos o las variantes subyacentes en regiones de ligadura de oligonucleótidos pueden afectar a los alelos que se estén comprobando y, en consecuencia, a las llamadas realizadas.
- ▶ El ensayo no puede determinar si la orientación de la variante Poli-TG/Poli-T respecto de la variante R117H es del tipo cis-trans. En el caso de los pacientes con una variante R117H, se deben realizar pruebas adicionales para determinar si una variante Poli-TG/Poli-T, que podría afectar al fenotipo clínico (por ejemplo, 12-13[TG] o 5T), se encuentra en orientación cis-trans respecto de la variante R117H.
- ▶ Poli-TG/Poli-T son regiones homopoliméricas conocidas por ser difíciles de interpretar con ensayos basados en secuencias debido al deslizamiento de la polimerasa. Se obtuvo un índice de llamadas incorrectas del 0,9 % (4/448) con los resultados de Poli-TG/Poli-T, lo que arrojó una discrepancia de ± 1 TG en comparación con la secuenciación bidireccional de Sanger ([Tabla 16](#)).

Limitaciones del procedimiento del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística

- ▶ Para uso diagnóstico *in vitro*.
- ▶ Los resultados obtenidos mediante el ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística se deben utilizar e interpretar en el contexto de una evaluación clínica completa.
- ▶ El ensayo secuencia las siguientes regiones del gen CFTR:
 - ▶ Todas las regiones de codificación de proteínas del gen CFTR en 27 exones
 - ▶ Entre 5 y 10 bases de secuencia intrónica adyacente
 - ▶ 100 nucleótidos de secuencia intrónica en las regiones no traducidas 5' y 3'
 - ▶ Dos mutaciones intrónicas profundas (1811+1,6kbA>G y 3489+10kbC>T)
 - ▶ La secuencia Poli-TG/Poli-T ubicada en el intrón 9
 - ▶ Un total de 5206 posiciones/regiones de los 188 702 pares de bases posibles en el gen.
- ▶ El ensayo se ha diseñado para la secuenciación de las regiones de codificación de proteínas y los límites de intrones/exones del gen CFTR, y no incluye todas las regiones intrónicas ni las deleciones de gran tamaño. En consecuencia, un resultado global de "en estado natural" no garantiza que otras mutaciones/variantes del regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) no estén presentes en las muestras que se analizan.
 - ▶ El ensayo se ha diseñado para detectar dos deleciones específicas de gran tamaño: CFTRdele2,3 y CFTRdele22,23. El ensayo no puede detectar o identificar otras deleciones de gran tamaño. Este ensayo solo está validado para las inserciones y deleciones de hasta 3 pb.

- ▶ Todas las inserciones o deleciones se alinean a la izquierda en las regiones homopoliméricas, a diferencia de las alineadas a la derecha siguiendo la nomenclatura HGVS. Por ejemplo, la variante c.313delA (con el contexto de secuencia GAATC) se identifica como una deleción G-ATC, pero la deleción se registra en dbSNP como una deleción GA-TC. Las 135 variaciones de fibrosis quística (FQ) enumeradas en la base de datos CFTR2 como causantes de la enfermedad (conforme a la versión 04/10/2012 de la base de datos de variantes) son una excepción de lo anterior. Conforme a los registros, todas las deleciones en las regiones homopoliméricas incluidas en este conjunto de variaciones coinciden con las notificaciones de variantes esperadas según la base de datos CFTR2.¹³
- ▶ El ensayo tiene una limitación en cuanto a la detección de deleciones en ubicaciones genómicas específicas de las regiones secuenciadas. En la **Tabla 4** se enumeran las coordenadas genómicas con deleciones que el ensayo no puede identificar. El ensayo no puede detectar las deleciones que incluyan la base o las bases de la columna de limitaciones.

Tabla 4 Coordenadas genómicas en las que no se pueden detectar las deleciones

Región del gen de CFTR	Coordenadas genómicas del hg19 (cromosoma 7)
CFTR_Exon1	117120041; 117120211
CFTR_Exon3	117149091
CFTR_Exon4	117170953-117170954*; 117171082
CFTR_Exon5	117174362
CFTR_Exon6	117175417
CFTR_Exon7	117176621
CFTR_Exon8	117180176-117180177*
CFTR_Exon9	117182126
CFTR_Exon10	117188771
CFTR_Exon11	117199544-117199545*; 117199697
CFTR_Exon12	117227802
CFTR_Exon14	117232106-117232107*; 117232466-117232467*; 117232609
CFTR_Exon17	117243705; 117243843
CFTR_Exon18	117246751
CFTR_Exon19	117250688
CFTR_Exon20	117251788
CFTR_Exon22	117267721
CFTR_Exon23	117282597
CFTR_Exon24	117292953
CFTR_Exon25	117304740-117304741*; 117304869
CFTR_Exon26	117305518
CFTR_Exon27	117307178

*Las únicas deleciones que no se pueden detectar son las que incluyen las dos bases que se muestran aquí. Por ejemplo, en la región Exon8, las únicas deleciones que no se pueden detectar son las iguales o superiores a 2 pb que incluyan las bases en las coordenadas genómicas 117180176 y 117180177. Una deleción de base sencilla en las coordenadas 117180176 o 117180177 se puede detectar.

- ▶ Si la coordenada afectada que se muestra en la **Tabla 4** es la base más a la izquierda de la región homopolimérica, no se puede detectar una deleción de cualquier otra posición de la elongación homopolimérica porque no se puede distinguir de una deleción en la coordenada afectada.

- ▶ El ensayo no puede detectar un total de cinco variantes enumeradas en la base de datos clínica ClinVar (acceso a la versión de diciembre de 2014 de la base de datos). Estas cinco variantes específicas se incluyen en la **Tabla 5**. Esta limitación del ensayo no afecta a ninguna de las variantes enumeradas en la base de datos de la fibrosis quística, CFTR2 (versión 04/10/2012 de la base de datos). No existían datos disponibles para ninguna de las variantes.

Tabla 5 Variantes conocidas no detectadas por el ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística

N.º de variante	ID de ClinVar	Región del gen de CFTR	Ubicación genómica (cromosoma 7)	Nombre de ADNc (HGVS)	Nombre de proteína (HGVS)	ID de rs
1	RCV000046424	CFTR_Exon3	117149091	c.168delA	p.Glu56Aspfs	rs397508269
2	RCV000046687	CFTR_Exon17	117243703-117243704*	c.2775_2776delTT	p.Leu926Alafs	rs397508433
3	RCV000046688	CFTR_Exon17	117243705	c.2777delT	p.Leu926Cysfs	rs397508434
4	RCV000046782	CFTR_Exon19	117250690*	c.3106delA	p.Thr1036Profs	rs397508497
5	RCV000046857	CFTR_Exon20	117251789*	c.3294delG	p.Trp1098Cysfs	rs397508534

*En estos casos, las coordenadas afectadas están incluidas en una región homopolimérica.

- ▶ Las variantes identificadas con este ensayo varían en frecuencia en función de las distintas poblaciones. No es posible validar todas las combinaciones de variantes que se pudieron detectar en el gen CFTR con este ensayo. Se recomienda que el usuario confirme las variantes excepcionales y nuevas con un método de referencia validado.
- ▶ Del mismo modo que con cualquier ensayo basado en hibridación, los polimorfismos, las mutaciones, las inserciones o las deleciones subyacentes en regiones de oligonucleótidos unidos pueden afectar a los alelos que se comprueban y, en consecuencia, las llamadas realizadas.
- ▶ Para las variantes complejas en las que se produce una deleción y una inserción en el mismo punto, el ensayo puede identificarlo como dos variantes independientes muy cercanas. La fase de hebra adelantada de las variantes no se evalúa y se deben tener en cuenta otras posibles soluciones para la secuencia detectada. Consulte la **Tabla 6** para ver un ejemplo de una variante compleja de este tipo.

Tabla 6 Ejemplo de variante compleja

Contexto de la secuencia (referencia)	GAAGAAATT
Secuencia observada para la variante	GAAT -- ATT
Variante esperada	Deleción de GAA, inserción de T (los dos cambios en el mismo cromosoma)
Variantes identificadas mediante el ensayo	SNP (G>T); deleción de AA

- ▶ Si se identifican más de dos variantes para una muestra, se recomienda que el usuario verifique el resultado; para ello, deberá repetir la muestra mediante el instrumento MiSeqDx con una extracción nueva de ADNg a fin de descartar la contaminación cruzada de la dicha muestra.



NOTA

Se debe tener en cuenta la ordenación de haplotipos cuando se detectan dos o más variantes. Este ensayo no puede determinar si las variantes están en orientación cis-trans respecto de otras variantes.

- ▶ El ensayo no puede determinar si la orientación de la variante Poli-TG/Poli-T respecto de las demás variantes es del tipo cis-trans. En el caso de los pacientes con una variante R117H, se deben realizar pruebas adicionales para determinar si una variante Poli-TG/Poli-T, que podría afectar al fenotipo clínico (por ejemplo, 12-13[TG] o 5T), se encuentra en orientación cis-trans. Poli-TG/Poli-T son regiones homopoliméricas conocidas por ser difíciles de secuenciar debido al deslizamiento de la polimerasa.

Componentes del producto

Kit TruSight Cystic Fibrosis está formado por los siguientes componentes:

- ▶ TruSight Cystic Fibrosis Library Prep (n.º de catálogo 20036925)

Reactivos suministrados

Ilumina suministra los reactivos para TruSight Cystic Fibrosis Library Prep. El kit se ha configurado para 1-4 usos con un máximo de 96 muestras por kit.

TruSight Cystic Fibrosis Library Prep (caja 1)

Los reactivos de la caja 1 se suministran congelados y permanecen estables cuando se almacenan a una temperatura de entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los reactivos permanecen estables durante un máximo de seis ciclos de congelación y descongelación cuando se llevan a cabo hasta la fecha de caducidad especificada.

Tabla 7 Reactivos de preamplificación de la caja 1A

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Grupo de oligonucleótidos de fibrosis quística	1 tubo	600 μl	Solución acuosa tamponada que contiene oligonucleótidos específicos para el gen <i>CFTR</i> .	Entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$
Tampón de hibridación	1 tubo	4,32 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales y formamida.	Entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$
Mezcla de extensión-ligadura	1 tubo	4,8 ml	Solución acuosa tamponada que contiene una mezcla patentada de polimerasas de ADN, ligasa de ADN y dNTP.	Entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$
Cebadores del índice 2 (A501-A508)	1 tubo por cebador	192 μl	Cebadores de PCR con secuencias de índice y adaptadores de secuenciación.	Entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$
Cebadores de índice 1 (A701-A712)	1 tubo por cebador	128 μl	Cebadores de PCR con secuencias de índice y adaptadores de secuenciación.	Entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$
Polimerasa de PCR	1 tubo	56 μl	Polimerasa de ADN patentada.	Entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$
Mezcla maestra de PCR	1 tubo	2,8 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales y dNTP.	Entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tabla 8 Reactivos de posamplificación de la caja 1B

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Diluyente de normalización de bibliotecas	1 tubo	4,6 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales, 2-mercaptoetanol y formamida.	Entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$
Tampón de dilución de biblioteca	1 tubo	4,5 ml	Solución acuosa tamponada	Entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$
Control interno PhiX	1 tubo	10 μl	Solución acuosa tamponada que contiene ADN genómico PhiX.	Entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$

TruSight Cystic Fibrosis Library Prep (caja 2)

Los reactivos de la caja 2 se suministran a temperatura ambiente y permanecen estables cuando se almacenan a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C hasta la fecha de caducidad especificada.

Tabla 9 Reactivos de preamplificación de la caja 2

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Placa del filtro	4 placas	N/A	Placa de microtitulación de polipropileno con una membrana de poliétersulfona modificada	Entre 15 °C y 30 °C

Tabla 10 Reactivos de posamplificación de la caja 2

Componente	Cantidad	Volumen de llenado (ml)	Principios activos	Almacenamiento
Tampón de elución	1 tubo	4,8	Solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de almacenamiento de biblioteca	1 tubo	3,5	Solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C

TruSight Cystic Fibrosis Library Prep (caja 3)

Los reactivos de la caja 3 se suministran refrigerados y permanecen estables cuando se almacenan a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C hasta la fecha de caducidad especificada.

Tabla 11 Reactivos de preamplificación de la caja 3A

Componente	Cantidad	Volumen de llenado (ml)	Principios activos	Almacenamiento
Tampón de lavado restrictivo	1 botella	24	Solución acuosa tamponada que contiene sales, 2-mercaptoetanol y formamida.	Entre 2 °C y 8 °C
Tampón de lavado universal	1 tubo	4,8	Solución acuosa tamponada que contiene sales.	Entre 2 °C y 8 °C

Tabla 12 Reactivos de posamplificación de la caja 3B

Componente	Cantidad	Volumen de llenado (ml)	Principios activos	Almacenamiento
Bolas de limpieza de PCR	1 tubo	5	Solución acuosa tamponada que contiene bolas paramagnéticas de fase sólida y polietilenglicol.	Entre 2 °C y 8 °C
Lavado de normalización de bibliotecas	2 tubos	4,8	Solución acuosa tamponada que contiene sales, 2-mercaptoetanol y formamida.	Entre 2 °C y 8 °C
Bolas de biblioteca	1 tubo	1,2	Solución acuosa tamponada que contiene bolas paramagnéticas de fase sólida.	Entre 2 °C y 8 °C

Reactivos necesarios no suministrados

Reactivos de preamplificación

- ▶ NaOH 10 N (preparación a partir de comprimidos o uso de una solución estándar)
- ▶ Tampón de TE
- ▶ Agua sin ARNasa ni ADNasa

Reactivos de posamplificación

- ▶ NaOH 10 N (preparación a partir de comprimidos o uso de una solución estándar)
- ▶ Etanol (EtOH) puro para biología molecular
- ▶ Tampón de TE
- ▶ Agua sin ARNasa ni ADNasa

Reactivos MiSeqDx

- ▶ Kit de reactivos MiSeqDx v. 3 (n.º de catálogo 20012552 o 20037124, según la región).
- ▶ Hipocloruro sódico al 5 %
- ▶ Tween 20
- ▶ Agua de laboratorio

Almacenamiento y manipulación

- 1 La temperatura ambiente se define como la temperatura que oscila entre 15 °C y 30 °C.
- 2 El tampón de hibridación, el tampón de lavado restrictivo y el diluyente de normalización de bibliotecas pueden formar precipitados o cristales observables a simple vista. Antes del uso, agite en vórtice con fuerza y, a continuación, inspeccione visualmente para asegurarse de que no haya precipitados.
- 3 Siga las prácticas recomendadas siguientes al manipular bolas de limpieza de PCR y bolas de biblioteca:
 - ▶ Las bolas nunca se deben congelar.
 - ▶ Deje que las bolas alcancen la temperatura ambiente.
 - ▶ Justo antes del uso, agite las bolas hasta que queden bien suspendidos y el color tenga un aspecto homogéneo.
 - ▶ Mezcle bien la muestra después de añadir las bolas pipeteando arriba y abajo diez veces. Se puede utilizar un agitador para mezclar bien las muestras.
 - ▶ Incube la mezcla de bolas/muestra a temperatura ambiente durante el tiempo indicado.
 - ▶ Para utilizar el soporte magnético, siga las instrucciones. Antes de aspirar, espere a que la solución quede aclarada. Mantenga la placa en el soporte magnético mientras aspira lentamente el sobrenadante y evite alterar las bolas apartadas.
- 4 No congele las bolas de biblioteca ni las mezcle con el reactivo del diluyente de normalización de bibliotecas si no se van a utilizar de forma inmediata.

Materiales y equipo

Materiales y equipo suministrados que se venden por separado

- ▶ Instrumento MiSeqDx, n.º de catálogo DX-410-1001
- ▶ Kit de fijación de placa de índices TruSeq, n.º de catálogo FC-130-1005
- ▶ Kit de collar y fijación de placa de índices TruSeq, n.º de catálogo FC-130-1007
- ▶ Tapones de recambio para el adaptador de índices, n.º de catálogo DX-502-1003
- ▶ Tubo MiSeq, n.º de catálogo MS-102-9999

Materiales y equipo necesarios, no suministrados

Materiales y equipo de preamplificación

- ▶ **Bloque de calor:** Se precisa un bloque de calor para una placa de 96 pocillos. Los bloques de calor con tapas calientes se pueden utilizar. No se recomienda el uso de cicladores térmicos y bloques de calor con refrigeración activa (por ejemplo, efecto Peltier, refrigeración termoeléctrica) para el paso de hibridación. El paso de refrigeración pasiva es fundamental para una hibridación óptima. El bloque de calor debe cumplir con las especificaciones de rendimiento siguientes:
 - ▶ Rango de temperatura: Ambiental de +5 °C a 99 °C
 - ▶ Regulación de temperatura: $\pm 0,1$ °C a 37 °C; $\pm 0,4$ °C a 60 °C
- ▶ **Incubadora de muestras:** Se precisa una incubadora (horno de hibridación). La incubadora debe cumplir con las especificaciones de rendimiento siguientes:
 - ▶ Rango de temperatura: 10 °C a 100 °C
 - ▶ Regulación de temperatura: $\pm 0,2$ °C
- ▶ **Centrifugadora de sobremesa:** Una centrifugadora de sobremesa con control de temperatura que pueda mantener 20 °C. Se precisa una centrifugadora independiente en el área de posamplificación. Se puede utilizar cualquier centrifugadora de placas que admita una placa de 96 pocillos con unidad de filtro y respete las velocidades designadas del protocolo (de 280 a 2400 × g).
- ▶ **Pipetas de precisión:** Se precisa un conjunto de pipetas de precisión. Se precisa un conjunto independiente en el área de posamplificación. Se precisa el uso de pipetas de precisión para garantizar la administración precisa de reactivo y muestra. Se pueden utilizar pipetas de un solo canal o multicanal si se calibran con frecuencia y ofrecen precisión del 5 % o menos del volumen indicado.
- ▶ **Consumibles:** Se precisan los consumibles siguientes:
 - ▶ Placas de PCR con faldones de 96 pocillos de 0,2 ml de polipropileno o equivalente
 - ▶ Placas de almacenamiento de 96 pocillos de 0,8 ml (placas MIDI)
 - ▶ Recipiente de solución de PVC sin ADNasa ni ARNasa (cubeta)
 - ▶ Junta con lámina de aluminio adhesiva
 - ▶ Sello para placas de PCR adecuado
 - ▶ Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles
 - ▶ Tubos cónicos de 15 ml

Materiales y equipo de posamplificación

- ▶ **Ciclador térmico:** Se precisa un ciclador térmico. El ciclador térmico debe tener una tapa caliente y cumplir con las especificaciones de rendimiento siguientes:
 - ▶ Rango de control de temperatura: 4 °C a 99 °C
 - ▶ Precisión de control: $\pm 0,25$ °C de 35 °C a 99 °C
- ▶ **Agitador de microplacas:** Se precisa un agitador de microplacas en el área de posamplificación del laboratorio. El agitador de placas debe cumplir con las especificaciones de rendimiento siguientes:
 - ▶ Velocidad de mezcla máx.: 3000 r/min
 - ▶ Rango de velocidad de mezcla: 200 a 3000 r/min
- ▶ **Centrifugadora de sobremesa:** Se precisa una centrifugadora de sobremesa que pueda mantener 20 °C. Se precisa una centrifugadora independiente en el área de preamplificación. Se admite cualquier centrifugadora de placas que alcance las velocidades indicadas del protocolo (de 280 a 2400 × g).
- ▶ **Bloque de calor:** Se precisa un bloque de calor para tubos. El bloque de calor debe cumplir con las especificaciones de rendimiento siguientes:
 - ▶ Rango de temperatura: Ambiental de +5 °C a 99 °C
 - ▶ Regulación de temperatura: $\pm 0,1$ °C a 37 °C; $\pm 0,4$ °C a 60 °C

- ▶ **Soporte magnético:** Se precisa un soporte magnético para una placa de 96 pocillos. Se obtiene un mejor resultado cuando los imanes se encuentran en un lado del soporte y no en la parte inferior.
- ▶ **Pipetas de precisión:** Se precisa un conjunto de pipetas de precisión. Es necesario un conjunto independiente en el área de preamplificación. Se precisa el uso de pipetas de precisión para garantizar la administración precisa de reactivo y muestra. Se pueden utilizar pipetas de un solo canal o multicanal si se calibran con frecuencia y ofrecen precisión del 5 % o menos del volumen indicado.
- ▶ **Centrifugadora de sobremesa:** Una centrifugadora de sobremesa con control de temperatura que pueda mantener 20 °C y que acepte tubos de microcentrifugado. Se admite cualquier centrifugadora que alcance las velocidades indicadas del protocolo (de 280 a 1000 × g).
- ▶ **Consumibles:** Se precisan los consumibles siguientes:
 - ▶ Placas de PCR con faldones de 96 pocillos de 0,2 ml de polipropileno o equivalente
 - ▶ Placas de almacenamiento de 96 pocillos de 0,8 ml (placas MIDI)



NOTA

Asegúrese de que la placa de 96 pocillos sea compatible con el soporte magnético.

- ▶ Tubos cónicos de 15 ml y 50 ml
- ▶ Tubos de microcentrifugado (recomendados con cierre de rosca)
- ▶ Gradillas de ocho tubos de PCR
- ▶ Recipientes de solución de PVC sin ADNasa ni ARNasa (cubeta)
- ▶ Sellos de película de aluminio adhesiva
- ▶ Sellos adhesivos de placas de un solo uso
- ▶ Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles

Recopilación, transporte y almacenamiento de muestras



NOTA

Manipule todas las muestras como si fueran agentes potencialmente infecciosos.

- ▶ Se pueden utilizar muestras de sangre completa recogidas en tubos EDTA_{K2}.
- ▶ Las muestras de sangre total se pueden almacenar durante un máximo de siete días a temperatura ambiente, un máximo de 30 días a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C o un máximo de 30 días congeladas a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C.
- ▶ El transporte de sangre completa no deberá llevarse a cabo una vez pasado un período de siete días a temperatura ambiente, 30 días a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C o bien 30 días congeladas a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C. El transporte de sangre total debe cumplir con la regulación nacional, federal, estatal y local en materia de transporte de agentes etiológicos.
- ▶ No se han observado efectos adversos en el rendimiento del ensayo al someter el ADN genómico a seis ciclos de congelación y descongelación.
- ▶ No se han observado efectos adversos en el rendimiento del ensayo con muestras de sangre total con presencia elevada de bilirrubina, colesterol, triglicéridos, EDTA o hemoglobina.

Advertencias y precauciones



PRECAUCIÓN

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

**ADVERTENCIA**

Este conjunto de reactivos contiene sustancias químicas potencialmente peligrosas. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Utilice un equipo de protección, incluidos gafas, guantes y batas de laboratorio adecuados para el riesgo de exposición. Manipule los reactivos utilizados como residuos químicos y deséchelos de conformidad con las normativas y leyes regionales, nacionales y locales aplicables. Para obtener más información sobre seguridad, salud y medioambiente, consulte la hoja de datos de seguridad en support.illumina.com/sds.html. (Consulte la sección *Reactivos suministrados* en la [página 12](#) para obtener más información).

- ▶ Algunos componentes de este ensayo contienen 2-mercaptoetanol, un agente reductor. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Utilícelo en un área bien ventilada y deseche los contenedores y los contenidos no utilizados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona. Para obtener más información sobre seguridad, salud y medioambiente, consulte la hoja de datos de seguridad en support.illumina.com/sds.html. (Consulte la sección *Reactivos suministrados* en la [página 12](#) para obtener más información).
- ▶ Algunos componentes de este ensayo contienen formamida, una amida alifática que es una toxina que puede alterar la capacidad reproductora. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Utilice un equipo de protección que incluya protección ocular, guantes y bata de laboratorio. Manipule los reactivos usados como residuos químicos y deséchelos según se establece en las normativas de seguridad oficiales de su zona. Para obtener más información sobre seguridad, salud y medioambiente, consulte la hoja de datos de seguridad en support.illumina.com/sds.html. (Consulte la sección *Reactivos suministrados* en la [página 12](#) para obtener más información).
- ▶ Manipule todas las muestras como si fueran agentes potencialmente infecciosos.
- ▶ El incumplimiento de los procedimientos descritos puede provocar resultados erróneos o una reducción considerable de la calidad de las muestras.
- ▶ Utilice las precauciones rutinarias del laboratorio. No pipetee con la boca. No coma, beba ni fume en las zonas de trabajo designadas. Utilice 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.
- ▶ No utilice los componentes del ensayo una vez alcanzada la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja del ensayo. No intercambie los componentes del ensayo de lotes de ensayo distintos. Los lotes de ensayo se identifican con la etiqueta de la caja del ensayo.
- ▶ Para evitar la degradación de las muestras o los reactivos, asegúrese de que todos los vapores de hipocloruro sódico se hayan disipado completamente antes de iniciar el protocolo.
- ▶ Se precisan prácticas de laboratorio adecuadas y procedimientos óptimos en materia de higiene en laboratorios para proteger los productos de PCR frente a la contaminación de reactivos, instrumentos y muestras de ADN genómico. La contaminación mediante PCR puede conllevar resultados poco precisos y fiables.
- ▶ 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 (tales como cambios evidentes en el color del reactivo o un aspecto turbio con contaminación microbiana), no utilice los reactivos.
- ▶ Para evitar la contaminación, separe físicamente las áreas de preamplificación y posamplificación y asegúrese de que dispongan de equipos específicos (tales como pipetas, puntas de pipeta, mezclador vorticial y centrifugadora).
- ▶ Evite la contaminación cruzada. Utilice puntas de pipeta nuevas entre muestras y dispensación de reactivos. Mezcle las muestras con una pipeta y centrifugue la placa cuando se indique. No agite las placas. El uso de puntas resistentes a los aerosoles reduce el riesgo de contaminación por restos de amplicones y de contaminación cruzada entre muestras.

- ▶ El apareamiento de muestras de índice debe coincidir con la información de muestras introducida para el experimento de MiSeqDx. Las incoherencias entre la información de muestras y la disposición de placas provocará la pérdida de identificación de muestras positivas y la generación de informes con resultados incorrectos.
- ▶ Para los pasos de lavado, prepare siempre etanol nuevo al 80 %. El etanol puede absorber agua del aire y afectar los resultados.
- ▶ Cumpla el tiempo de secado especificado siguiendo el paso relativo al soporte magnético para garantizar que el etanol se evapora completamente. Los restos de etanol pueden afectar el rendimiento de las reacciones posteriores.
- ▶ Almacene los componentes del ensayo a la temperatura especificada en las áreas de preamplificación y posamplificación designadas.
- ▶ Los ciclos de congelación y descongelación repetidos (hasta seis) de los componentes de la caja 1 no afectan a la integridad del ensayo.
- ▶ No mezcle el grupo de oligonucleótidos de fibrosis quística y el tampón de hibridación para el almacenamiento. Si se combinan, el grupo de oligonucleótidos de fibrosis quística personalizados se vuelve inestable, incluso aunque se almacene congelado.
- ▶ No es aconsejable el uso de cicladores térmicos con refrigeración activa (por ejemplo, efecto Peltier, refrigeración termoeléctrica) para el paso de hibridación. El paso de refrigeración pasiva es fundamental para una hibridación óptima.
- ▶ Añada siempre polimerasa de PCR a la mezcla maestra de PCR justo antes del uso. No almacene nunca la mezcla maestra combinada.
- ▶ Durante el paso de normalización de bibliotecas, es muy importante resuspender por completo el pellet de bolas de la biblioteca. Esto resulta fundamental para lograr una densidad de grupos coherente en la celda de flujo del instrumento MiSeqDx.
- ▶ Cumpla los tiempos de incubación especificados en el paso de normalización de bibliotecas. Una incubación inadecuada puede afectar a la representación de bibliotecas y la densidad de grupos.
- ▶ Debido al número de transferencias de placas y al potencial de contaminación consiguiente, preste un cuidado especial para garantizar que el contenido de los pocillos permanece completamente en el pocillo. Evite las salpicaduras de contenido.
- ▶ La recomendación de entrada de ADN de 250 ng permite la variación en la cantidad de ADN. Este nivel de entrada determina el rendimiento del ensayo.
- ▶ Las variantes de muestras con la designación No Call (Ausencia de llamada) en el informe de pruebas indican que los datos correspondientes a dichas posiciones de las variantes no satisficieron los umbrales de secuenciación definidos. No notifique las variantes con la designación No Call (Ausencia de llamada) a menos que, al repetir las pruebas, se arrojen valores que satisfagan los umbrales definidos y ya no cuenten con la designación No Call (Ausencia de llamada).

Siglas

Tabla 13 Siglas de TruSight Cystic Fibrosis Library Prep

Sigla	Definición
AMP	Placa de amplificación
CLP	Placa de limpieza
DAL	Biblioteca de amplicones diluida
FPU	Unidad de placa del filtro
HYB	Placa de hibridación
LNP	Placa de normalización de bibliotecas
NTC	Control sin cadena molde
PAL	Biblioteca de amplicones agrupados
SGP	Placa de almacenamiento

Otros recursos

Las páginas de asistencia de TruSight Cystic Fibrosis del sitio web de Illumina ofrecen información sobre el software, los recursos de formación y la compatibilidad de productos, así como la siguiente documentación. Revise siempre las páginas de asistencia para obtener las versiones más recientes.

Recurso	Descripción
<i>Guía de flujo de trabajo del módulo de análisis de 139 variantes de fibrosis quística 2.0 de Local Run Manager (n.º de documento 1000000100945)</i>	Facilita las instrucciones necesarias para configurar los parámetros de experimentos de secuenciación y de análisis del módulo de análisis de 139 variantes de FQ 2.0.
<i>Guía de flujo de trabajo del módulo de análisis de secuenciación clínica de fibrosis quística 2.0 de Local Run Manager (n.º de documento 1000000100946)</i>	Facilita las instrucciones necesarias para configurar los parámetros de experimentos de secuenciación y de análisis del módulo de análisis de secuenciación clínica de FQ 2.0.
<i>Guía de referencia del software Local Run Manager para MiSeqDx (n.º de documento 1000000011880)</i>	Proporciona instrucciones para crear un experimento, hacer un seguimiento de su estado, analizar los datos de secuenciación y ver los resultados en el instrumento MiSeqDx.
<i>Guía de referencia del instrumento MiSeqDx para MOS v. 2 (documento con n.º de referencia 1000000021961)</i>	Proporciona instrucciones para configurar y secuenciar experimentos, incluidos los procedimientos de mantenimiento para el instrumento MiSeqDx.

Notas de procedimiento

- ▶ Illumina precisa la inclusión de una muestra de ADN de control positivo y un control negativo (NTC o control sin plantilla) en cada experimento, que se define como un conjunto de muestras procesadas en paralelo. La muestra de ADN de control positivo debe contar con unas características bien definidas con una o más variantes de CFTR conocidas. Illumina recomienda el uso de un control natural. El control natural se debe procesar como muestra y no debe sustituir al control positivo o negativo.
- ▶ Antes de comenzar el ensayo de 139 variantes o el ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística, extraiga y cuantifique el ADN de sangre completa.
- ▶ Se puede utilizar cualquier método de extracción de ADN validado.
- ▶ Cuantifique el ADN mediante el uso de un espectrómetro. Compruebe que el índice A260/A280 de la muestra de ADN es superior a 1,5. Normalice la muestra de ADN a 50 ng/μl. Cada muestra requiere 5 μl de ADN genómico (un total de 250 ng).

- ▶ Almacene los componentes del ensayo a la temperatura especificada en las áreas de preamplificación y posamplificación designadas.
- ▶ Los ciclos de congelación y descongelación repetidos (hasta seis) de los componentes de la caja 1 no afectan a la integridad del ensayo.

Productividad de muestras

Para el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística y el ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística, la producción de muestras por experimento de MiSeqDx puede ser de 24 a 96 muestras. Los cebadores de índice que se utilizan durante la amplificación PCR se deben elegir en función de la productividad final de muestras que se desee, con el fin de garantizar que cada biblioteca use una combinación de índices exclusiva.



NOTA

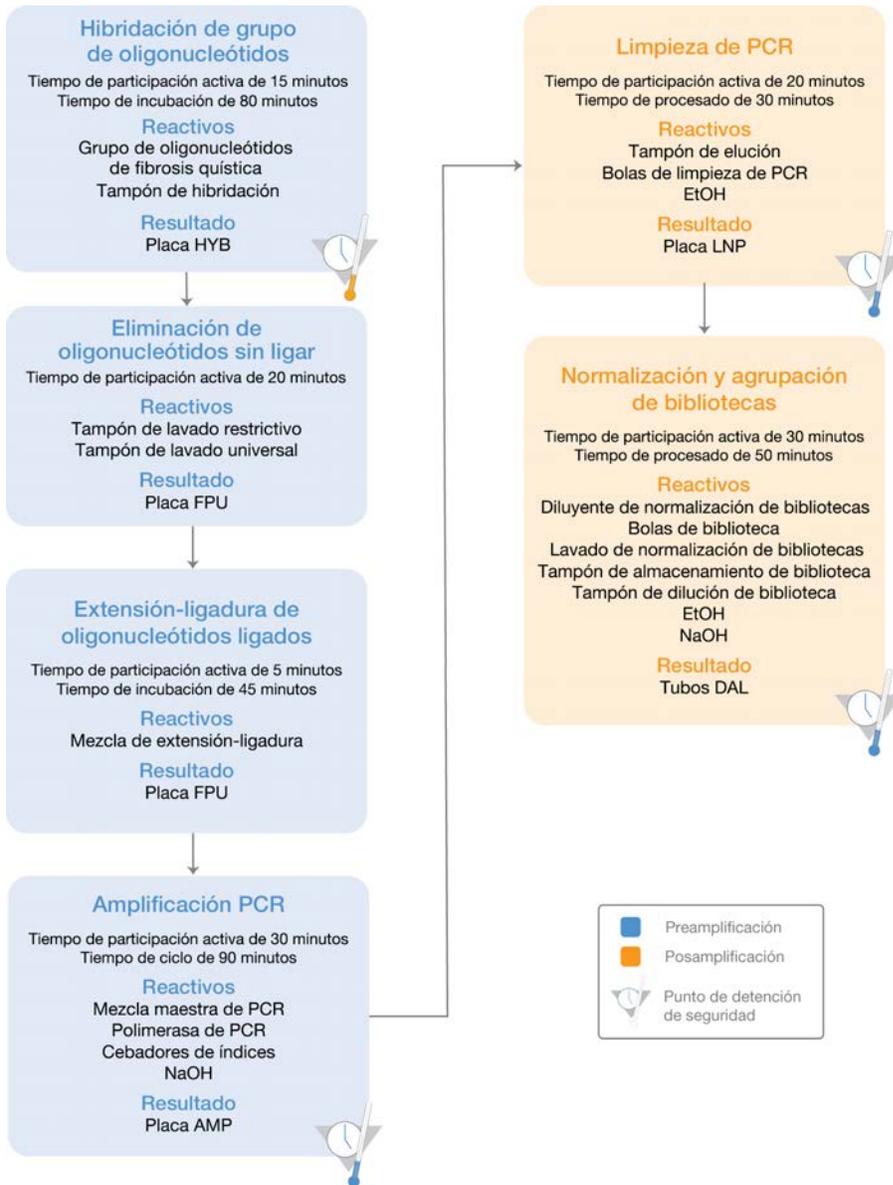
Illustra no aprueba continuar con menos de 24 muestras.

Flujo de trabajo de preparación de bibliotecas

El siguiente diagrama ilustra el flujo de trabajo de preparación de bibliotecas del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística y del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística. Entre los pasos de preamplificación, se incluyen la hibridación de grupo de oligonucleótidos, la eliminación de oligonucleótidos sin ligar y la extensión-ligadura de oligonucleótidos ligados. En el paso de amplificación PCR, la configuración de la placa de PCR tiene lugar en el área de preamplificación, mientras que la PCR en el termociclador se produce en el área de posamplificación. Entre los pasos de posamplificación, se incluyen la limpieza de PCR y la normalización y agrupación de bibliotecas.

Los puntos de detención segura se marcan entre los pasos.

Figura 1 Flujo de trabajo de preparación de bibliotecas del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística y del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística



Instrucciones de uso

TruSight Cystic Fibrosis Library Prep admite dos ensayos: el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística y el ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística. El flujo de trabajo de fibrosis quística TruSight incluye la selección de ensayos, la preparación de bibliotecas, la secuenciación y el lavado posterior al experimento. A excepción de la selección de ensayos, todos los pasos de los procedimientos son idénticos en ambos ensayos.

Selección del ensayo y configuración del experimento

- ▶ Si utiliza el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística, consulte [Uso del módulo de análisis de 139 variantes de fibrosis quística 2.0 de Local Run Manager en la página 22.](#)

- ▶ Si utiliza el ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística, consulte *Uso del módulo de análisis de secuenciación clínica de fibrosis quística 2.0 de Local Run Manager* en la página 23.

Uso del módulo de análisis de 139 variantes de fibrosis quística 2.0 de Local Run Manager

Configuración de parámetros

- 1 Inicie sesión en Local Run Manager.
- 2 Seleccione **Create Run** (Crear experimento) y, a continuación, seleccione **CF 139-Variant 2.0** (139 variantes de FQ 2.0).
- 3 Introduzca un nombre para el experimento de forma que se pueda identificar desde la secuenciación hasta el análisis.
Utilice caracteres alfanuméricos, espacios o guiones tanto normales como bajos (40 caracteres o menos).
- 4 **(Opcional)** Escriba una descripción.
Utilice caracteres alfanuméricos, espacios o guiones tanto normales como bajos (150 caracteres o menos).
- 5 Introduzca el número de lote y la fecha de caducidad para el kit de preparación de bibliotecas.

Definir las muestras para el experimento

Defina las muestras que se utilizarán en el experimento por medio de una de las opciones que se proponen a continuación.

- ▶ **Introducir las muestras de forma manual:** Utilice la tabla en blanco que aparece en la pantalla Create Run (Crear experimento). Aparecerán destacados los pocillos de muestra que se proponen.
- ▶ **Import Samples** (Importar muestras): Vaya a un archivo externo que tenga un formato de valores separados por comas (*.csv). En la pantalla Create Run (Crear experimento), se ofrece una plantilla que se puede descargar.

Introducción manual de las muestras

- 1 Proporcione a cada muestra un nombre exclusivo e introdúzcalo en el campo Sample Name (Nombre de la muestra).
Utilice caracteres alfanuméricos o guiones tanto normales como bajos (40 caracteres o menos).
- 2 Haga clic en el botón derecho y elija las muestras de control negativo y de control positivo.
Para guardar un experimento, este debe tener al menos un control positivo y otro negativo.
- 3 **(Opcional)** Introduzca la descripción de la muestra en la ficha Sample Description (Descripción de la muestra).
Utilice caracteres alfanuméricos o guiones tanto normales como bajos (50 caracteres o menos).
- 4 **(Opcional)** Seleccione un adaptador del Index 1 (Índice 1) del menú desplegable que aparece en el Index 1 (i7).
Este paso es opcional, ya que las combinaciones de índices i7 e i5 se rellenan automáticamente con una disposición predeterminada.
- 5 **(Opcional)** Seleccione un adaptador del Index 2 (Índice 2) del menú desplegable que aparece en el Index 2 (i5).
Este paso es opcional, ya que las combinaciones de índices i7 e i5 se rellenan automáticamente con una disposición predeterminada.
- 6 Haga clic en el icono **Print** (Imprimir) para ver la disposición de la placa.
- 7 Seleccione **Print** (Imprimir) para poder imprimir la disposición de la placa y utilizarla como referencia a la hora de preparar las bibliotecas.
- 8 **(Opcional)** Seleccione **Export** (Exportar) para exportar el archivo de información sobre las muestras.
- 9 Seleccione **Save Run** (Guardar experimento).
Si se han introducido menos de 24 muestras, se mostrará la ventana Insufficient Sample (Muestra insuficiente). Seleccione **Proceed** (Continuar) para continuar o **Cancel** (Cancelar) para editar las muestras.



PRECAUCIÓN

Ilumina no valida la secuenciación con bibliotecas agrupadas que contienen menos de 24 muestras.

Importar las muestras

La información de las muestras se puede importar desde dos tipos de archivos:

- ▶ Un archivo de información de las muestras que ha exportado anteriormente del módulo de 139 variantes de FQ 2.0 con la función Export (Exportación).
- ▶ Un archivo de plantilla que se puede generar seleccionando **Template** (Plantilla) en la pantalla Create Run (Crear experimento). El archivo que se usa como plantilla incluye los encabezados de columna adecuados para la importación, con información sobre los marcadores de posición en cada columna. Use un editor externo para personalizar el archivo de plantilla:
 - 1 Añada la información de cada muestra del experimento.
 - 2 Cuando haya añadido la información de todas las muestras, borre toda la información sobre los marcadores de posición que quede en las celdas sin usar.
 - 3 Guarde el archivo de plantilla.

Para importar la información de las muestras:

- 1 Seleccione **Import Samples** (Importar muestras), busque el archivo y selecciónelo.
- 2 Haga clic en el icono **Print** (Imprimir) para ver la disposición de la placa.
- 3 Seleccione **Print** (Imprimir) para poder imprimir la disposición de la placa y utilizarla como referencia a la hora de preparar las bibliotecas.
- 4 Seleccione **Save Run** (Guardar Experimento).
Si se han introducido menos de 24 muestras, se mostrará la ventana Insufficient Sample (Muestra insuficiente). Seleccione **Proceed** (Continuar) para continuar o **Cancel** (Cancelar) para editar las muestras.



PRECAUCIÓN

Ilumina no valida la secuenciación con bibliotecas agrupadas que contienen menos de 24 muestras.

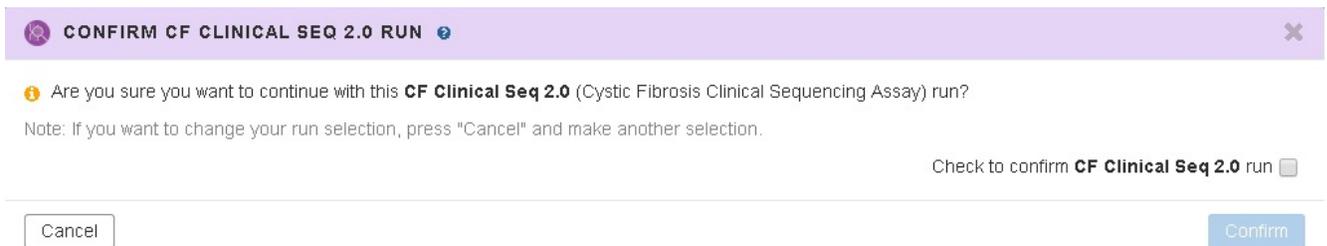
Editar un experimento

Para obtener instrucciones sobre cómo editar la información del experimento antes de comenzar la secuenciación, consulte la *Guía de referencia del software Local Run Manager para MiSeqDx (documento con n.º de referencia 100000011880)*.

Uso del módulo de análisis de secuenciación clínica de fibrosis quística 2.0 de Local Run Manager

Configuración de parámetros

- 1 Inicie sesión en Local Run Manager.
- 2 Seleccione **Create Run** (Crear experimento) y seleccione **CF Clinica Sq 2.0I** (Secuenciación clínica de FQ 2.0).
Aparecerá una ventana emergente para confirmar que **CF Clinical Seq 2.0** (Secuenciación clínica de FQ 2.0) es la selección prevista.



- 3 Marque la casilla y seleccione **Confirm** (Confirmar) para continuar (o bien seleccione **Cancel** [Cancelar] para volver a la pantalla principal).

- 4 Introduzca un nombre para el experimento de forma que se pueda identificar desde la secuenciación hasta el análisis.
Utilice caracteres alfanuméricos, espacios o guiones tanto normales como bajos (40 caracteres o menos).
- 5 **(Opcional)** Escriba una descripción.
Utilice caracteres alfanuméricos, espacios o guiones tanto normales como bajos (150 caracteres o menos).
- 6 Introduzca el número de lote y la fecha de caducidad para el kit de preparación de bibliotecas.

Definir las muestras para el experimento

Defina las muestras que se utilizarán en el experimento por medio de una de las opciones que se proponen a continuación.

- ▶ **Introducir las muestras de forma manual:** Utilice la tabla en blanco que aparece en la pantalla Create Run (Crear experimento). Aparecerán destacados los pocillos de muestra que se proponen.
- ▶ **Import Samples (Importar muestras):** Vaya a un archivo externo que tenga un formato de valores separados por comas (*.csv). En la pantalla Create Run (Crear experimento), se ofrece una plantilla que se puede descargar.

Introducción manual de las muestras

- 1 Proporcione a cada muestra un nombre exclusivo e introdúzcalo en el campo Sample Name (Nombre de la muestra).
Utilice caracteres alfanuméricos o guiones tanto normales como bajos (40 caracteres o menos).
- 2 Haga clic en el botón derecho y elija las muestras de control negativo y de control positivo.
Para guardar un experimento, este debe tener al menos un control positivo y otro negativo.
- 3 **(Opcional)** Introduzca la descripción de la muestra en la ficha Sample Description (Descripción de la muestra).
Utilice caracteres alfanuméricos o guiones tanto normales como bajos (50 caracteres o menos).
- 4 **(Opcional)** Seleccione un adaptador del Index 1 (Índice 1) del menú desplegable que aparece en el Index 1 (i7).
Este paso es opcional, ya que las combinaciones de índices i7 e i5 se rellenan automáticamente con una disposición predeterminada.
- 5 **(Opcional)** Seleccione un adaptador del Index 2 (Índice 2) del menú desplegable que aparece en el Index 2 (i5).
Este paso es opcional, ya que las combinaciones de índices i7 e i5 se rellenan automáticamente con una disposición predeterminada.
- 6 Haga clic en el icono **Print** (Imprimir) para ver la disposición de la placa.
- 7 Seleccione **Print** (Imprimir) para poder imprimir la disposición de la placa y utilizarla como referencia a la hora de preparar las bibliotecas.
- 8 **(Opcional)** Seleccione **Export** (Exportar) para exportar el archivo de información sobre las muestras.
- 9 Seleccione **Save Run** (Guardar experimento).
Si se han introducido menos de 24 muestras, se mostrará la ventana Insufficient Sample (Muestra insuficiente).
Seleccione **Proceed** (Continuar) para continuar o **Cancel** (Cancelar) para editar las muestras.



PRECAUCIÓN

Ilumina no valida la secuenciación con bibliotecas agrupadas que contienen menos de 24 muestras.

Importar las muestras

La información de las muestras se puede importar desde dos tipos de archivos:

- ▶ Un archivo de información de las muestras que ha exportado anteriormente del módulo de secuenciación clínica de fibrosis quística 2.0 con la función Export (Exportación).

- ▶ Un archivo de plantilla que se puede generar seleccionando **Template** (Plantilla) en la pantalla **Create Run** (Crear experimento). El archivo que se usa como plantilla incluye los encabezados de columna adecuados para la importación, con información sobre los marcadores de posición en cada columna. Use un editor externo para personalizar el archivo de plantilla:
 - 1 Añada la información de cada muestra del experimento.
 - 2 Cuando haya añadido la información de todas las muestras, borre toda la información sobre los marcadores de posición que quede en las celdas sin usar.
 - 3 Guarde el archivo de plantilla.

Para importar la información de las muestras:

- 1 Seleccione **Import Samples** (Importar muestras), busque el archivo y selecciónelo.
- 2 Haga clic en el icono **Print** (Imprimir) para ver la disposición de la placa.
- 3 Seleccione **Print** (Imprimir) para poder imprimir la disposición de la placa y utilizarla como referencia a la hora de preparar las bibliotecas.
- 4 Seleccione **Save Run** (Guardar Experimento).
Si se han introducido menos de 24 muestras, se mostrará la ventana **Insufficient Sample** (Muestra insuficiente). Seleccione **Proceed** (Continuar) para continuar o **Cancel** (Cancelar) para editar las muestras.



PRECAUCIÓN

Ilumina valida la secuenciación con bibliotecas agrupadas que contienen menos de 24 muestras.

Editar un experimento

Para obtener instrucciones sobre cómo editar la información del experimento antes de comenzar la secuenciación, consulte la *Guía de referencia del software Local Run Manager para MiSeqDx (documento con n.º de referencia 1000000011880)*.

Preparación de bibliotecas



NOTA

El flujo de trabajo de preparación de bibliotecas del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística y del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística es idéntico.

Hibridación de grupo de oligonucleótidos

Consumibles

- ▶ Placa de PCR de 96 pocillos
- ▶ Muestras de ADN genómico (ADNg)
- ▶ Tampón de hibridación
- ▶ Muestra de control positivo
- ▶ Grupo de oligonucleótidos de fibrosis quística
- ▶ Tampón de TE
- ▶ Junta con lámina de aluminio adhesiva

Preparación

1 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Tampón de hibridación	Entre -25 °C y -15 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente. Realice la mezcla en un mezclador vorticial para asegurarse de que todos los precipitados se hayan disuelto por completo y centrifugue brevemente los tubos para recoger el líquido.
Grupo de oligonucleótidos de fibrosis quística	Entre -25 °C y -15 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente. Realice la mezcla en un mezclador vorticial para asegurarse de que todos los precipitados se han disuelto por completo y centrifugue brevemente los tubos para recoger el líquido.

- 2 Deje que las muestras de ADN_g y la muestra de control positivo alcancen la temperatura ambiente.
- 3 Coloque un bloque caliente de 96 pocillos a 95 °C.
- 4 Precaliente una incubadora a 37 °C.

Procedimiento

- 1 Asigne la etiqueta "HYB" a una nueva placa de PCR de 96 pocillos.
- 2 Cree una placa de muestras según el gráfico de placa impreso de Local Run Manager.
- 3 Siguiendo la disposición de la placa generada por Local Run Manager, añada 5 µl de control negativo (por ejemplo, tampón de TE) al pocillo correspondiente de la placa HYB.
- 4 Añada 5 µl de muestra o control a 50 ng/µl (250 ng en total) de los pocillos correspondientes de la placa HYB.
- 5 Añada 5 µl del grupo de oligonucleótidos de fibrosis quística a cada pocillo de muestra.
- 6 Añada 40 µl de tampón de hibridación en cada muestra de la placa HYB.
- 7 Pipetee con cuidado arriba y abajo entre tres y cinco veces para mezclar.
- 8 Selle la placa HYB y centrifugue a 1000 × g a una temperatura de 20 °C durante un minuto.
- 9 Coloque la placa HYB en el bloque precalentado a 95 °C e incúbela durante un minuto.
- 10 Reduzca la temperatura del bloque de calor a 40 °C y sígalo incubando hasta que alcance los 40 °C (unos 80 minutos).

Para una hibridación óptima es fundamental una refrigeración gradual.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Cuando el bloque de calor alcanza 40 °C, la placa HYB permanece estable a 40 °C durante 2 horas.

Eliminación de oligonucleótidos sin ligar

Consumibles

- ▶ Mezcla de extensión-ligadura
- ▶ Placa del filtro
- ▶ Tampón de lavado restrictivo
- ▶ Tampón de lavado universal
- ▶ Placa MIDI

Preparación

1 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Mezcla de extensión-ligadura	Entre -25 °C y -15 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar.
Tampón de lavado restrictivo	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente. Agite con fuerza. Asegúrese de que se han disuelto todos los precipitados.
Tampón de lavado universal	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar.

2 Monte el conjunto de la unidad de la placa del filtro (FPU) **desde la parte superior hasta la parte inferior**:

- Tapa
- Placa del filtro
- Collar adaptador
- Placa MIDI

3 Realice un lavado previo a la membrana de la placa del filtro como se indica a continuación.

- a Añada 45 µl de tampón de lavado restrictivo en cada pocillo.
- b Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a 2400 × g a 20 °C durante cinco minutos.

4 Realice una comprobación para verificar que todos los pocillos de la placa de filtro se están drenando completamente. Si el tampón de lavado no se drena completamente, vuelva a centrifugar a 2400 × g a 20 °C hasta que haya pasado todo el líquido (alrededor de cinco o diez minutos más).



PRECAUCIÓN

Es imprescindible controlar la temperatura de la centrifugadora durante los pasos del lavado. Si la temperatura alcanza o supera los 25 °C, este exceso de temperatura provocará una mayor restricción en la ligadura del cebador. En casos aislados, si las muestras tienen SNV en las regiones de ligadura del cebador, el aumento de la restricción puede provocar la pérdida de alelos.

Procedimiento

- 1 Retire la placa HYB del bloque de calor y centrifugue a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- 2 Mediante el uso de una pipeta multicanal con configuración de pipeteo a 55 µl, transfiera el volumen íntegro de cada muestra a los pocillos correspondientes de la placa del filtro.
- 3 Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a 2400 × g a 20 °C durante cinco minutos.
- 4 Lave la placa del filtro como se indica a continuación.
 - a Añada 45 µl de tampón de lavado restrictivo en cada pocillo de muestra.
 - b Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a 2400 × g a 20 °C durante cinco minutos.
- 5 Lave la placa una **segunda** vez.
- 6 Si el tampón de lavado no se drena completamente, vuelva a centrifugar a 2400 × g a 20 °C hasta que se haya drenado todo el líquido (alrededor de cinco o diez minutos más).
- 7 Deseche todo el flujo recogido hasta este punto y vuelva a montar la FPU.
- 8 Añada 45 µl de tampón de lavado universal en cada pocillo de muestra.
- 9 Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a 2400 × g a 20 °C durante 10 minutos.
- 10 Asegúrese de que se haya drenado todo el líquido tras el centrifugado. Repita el centrifugado si es necesario.

Extensión-ligadura de oligonucleótidos ligados

Consumibles

- ▶ Mezcla de extensión-ligadura
- ▶ Junta con lámina de aluminio adhesiva

Procedimiento

- 1 Añada 45 µl de mezcla de extensión-ligadura en cada pocillo de muestra de la placa del filtro.
- 2 Selle la placa del filtro y, a continuación, cúbrala con la tapa.
- 3 Incube la FPU en la incubadora precalentada a 37 °C durante 45 minutos.
- 4 Mientras la placa de la FPU se incuba, prepare la placa de amplificación tal y como se describe en la sección siguiente.

Amplificación PCR

Consumibles

- ▶ Placa de PCR de 96 pocillos
- ▶ Sello para placas de PCR
- ▶ Cebadores de índices (A501-A508 y A701-A712)
- ▶ NaOH 10 N
- ▶ Mezcla maestra de PCR
- ▶ Polimerasa de PCR
- ▶ Tubo cónico de 15 ml

Preparación

- 1 Establezca qué cebadores de índice se van a utilizar de acuerdo con la disposición del gráfico de la placa indicada en Local Run Manager.
- 2 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Cebadores de índices (A501-A508 y A701-A712)	Entre -25 °C y -15 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
Polimerasa de PCR	Entre -25 °C y -15 °C	Déjela en el congelador hasta que sea necesario para preparar la solución de trabajo de PCR.
Mezcla maestra de PCR	Entre -25 °C y -15 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.

- 3 Prepare NaOH 0,05 N nuevo mediante la adición de 25 µl de NaOH 10 N en 4975 µl de agua sin ARNasa ni ADNasa.
- 4 Asigne la etiqueta "AMP" a una nueva placa de PCR de 96 pocillos.
- 5 Añada cebadores de índice a la placa AMP como se indica a continuación.
 - a Añada 4 µl de cebadores de índice 2 seleccionados (A501-A508) al pocillo correspondiente en la placa AMP.
 - b Deseche los tapones blancos originales y coloque tapones blancos nuevos.
 - c Añada 4 µl de cebadores de índice 1 seleccionados (A701 - A712) a la fila correspondiente de la placa AMP.

d Deseche los tapones naranjas originales y coloque tapones naranjas nuevos.

6 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Polimerasa de PCR	Entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Retírela de su almacenamiento y centrifúguela brevemente. Continúe inmediatamente al siguiente paso. Si la polimerasa PCR se va a utilizar para más preparaciones, vuelva a almacenarla después de crear la solución de trabajo de PCR.

7 Prepare la solución de trabajo de PCR como se indica a continuación.



NOTA

Entre las siguientes instrucciones, se incluyen los volúmenes necesarios para procesar 96 muestras. Si se procesan menos muestras, ajuste los volúmenes de forma pertinente para preservar los reactivos.

- Para 96 muestras, añada 56 μl de polimerasa de PCR a 2,8 ml de mezcla maestra de PCR.
- Invierta 20 veces para mezclar.

La solución de trabajo de PCR permanece estable a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Procedimiento

- Retire la FPU de la incubadora y, a continuación, retire el sello.
- Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a $2400 \times g$ a una temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante dos minutos.
- Añada 25 μl de NaOH 0,05 N en cada pocillo en la placa del filtro.
- Pipetee arriba y abajo cinco o seis veces.
- Cubra la placa del filtro con la tapa e incúbela a temperatura ambiente durante cinco minutos.
- Mientras la placa del filtro se incuba, transfiera 22 μl de la mezcla maestra de PCR a cada pocillo de la placa AMP que contiene cebadores de índice.
- Transfiera las muestras eluidas desde el filtro hasta la placa AMP como se indica a continuación.
 - Pipetee las muestras en la primera columna de la placa del filtro arriba y abajo cinco o seis veces.
 - Transfiera 20 μl desde la placa del filtro a la columna correspondiente de la placa AMP.
 - Pipetee con cuidado arriba y abajo cinco o seis veces para combinar bien el ADN con la mezcla maestra de PCR.
 - Repita los pasos de transferencia en las columnas restantes desde la placa del filtro a la placa AMP.
- Selle la placa AMP y asegúrela con un rodillo de goma.
- Centrifugue a $1000 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un minuto.
- Transfiera la placa AMP al área de posamplificación.
- Realice el proceso de PCR siguiendo este programa en un ciclador térmico:
 - ▶ $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante tres minutos
 - ▶ 25 ciclos de:
 - ▶ $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos
 - ▶ $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos
 - ▶ $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60 segundos
 - ▶ $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante cinco minutos
 - ▶ Mantenga la temperatura a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si no se procede de manera inmediata a la limpieza de PCR, la placa AMP puede permanecer en el ciclador térmico toda la noche o se puede almacenar a una temperatura de $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta 48 horas.

Limpieza de PCR

Consumibles

- ▶ Tubo cónico de 50 ml
- ▶ Sellos adhesivos de placas de un solo uso
- ▶ Dos placas MIDI
- ▶ Tampón de elución
- ▶ Bolas de limpieza de PCR

Preparación

- 1 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Bolas de limpieza de PCR	Entre 2 °C y 8 °C	Deje reposar durante 30 minutos hasta que alcance la temperatura ambiente.

- 2 En el caso de 96 muestras, prepare EtOH al 80 % recién preparado con 36 ml EtOH absoluto y 9 ml de agua sin ARNasa ni ADNasa. Mezcle bien el contenido.



NOTA

Si se procesan menos de 96 muestras, ajuste los volúmenes de forma pertinente para preservar los reactivos.

Procedimiento

- 1 Centrifugue la placa AMP a 1000 × g a una temperatura de 20 °C durante un minuto.
- 2 Asigne a una nueva placa MIDI la etiqueta CLP.
- 3 Invierta las bolas de limpieza de PCR 10 veces. Agite con fuerza y, a continuación, invierta 10 veces más. Inspeccione visualmente la solución para garantizar que las bolas están resuspendidas.
- 4 Añada 45 µl de bolas de limpieza de PCR en cada pocillo de la placa CLP.
- 5 Transfiera todo el producto de PCR de cada pocillo de la placa AMP al pocillo correspondiente de la placa CLP.
- 6 Selle la placa LNP y agítela en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante dos minutos.
- 7 Incube a temperatura ambiente sin agitar durante 10 minutos.
- 8 Coloque la placa en un soporte magnético y espere a que el líquido sea transparente (aproximadamente 2 minutos).
- 9 Con la placa CLP en el soporte magnético, extraiga y deseche con cuidado el sobrenadante.
- 10 Lave las bolas de la siguiente manera.
 - a Manténgalas en el soporte magnético y añada a cada pocillo 200 µl de EtOH al 80 % recién preparado.
 - b Espere al menos 30 segundos o hasta que el sobrenadante se distinga con claridad.
 - c Retire y deseche todo el sobrenadante de cada pocillo.
- 11 Lave las bolas una **segunda** vez.
- 12 Utilice una pipeta multicanal P20 con configuración de pipeteo a 20 µl para extraer el exceso de EtOH.
- 13 Retire la placa CLP del soporte magnético y deje secar las bolas durante 10 minutos.
- 14 Añada 30 µl de tampón de elución a cada muestra.
- 15 Selle la placa CLP y agítela en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante dos minutos. Tras agitar, verifique si las muestras se han resuspendido. En caso contrario, repita este paso.
- 16 Incube a temperatura ambiente durante dos minutos.

- 17 Coloque la placa LNP en el soporte magnético y espere a que el sobrenadante se distinga con claridad (aproximadamente 2 minutos).
- 18 Asigne a una nueva placa MIDI la etiqueta LNP.
- 19 Transfiera 20 µl de sobrenadante de cada pocillo de la placa CLP al pocillo correspondiente de la placa LNP.
- 20 **(Opcional)** Transfiera los 10 µl de sobrenadante restante de la placa CLP a la nueva placa y asígnele una etiqueta que incluya el nombre y la fecha del experimento. Almacene la placa a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C hasta la finalización del experimento de secuenciación y el análisis de los datos. Los productos de PCR limpios se pueden utilizar con fines de solución de problemas en caso de que se produzcan fallos en las muestras.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si se detiene en este punto, selle la placa LNP y centrifugue a 1000 × g a 20 °C durante un minuto. La placa permanece estable hasta tres horas a entre 2 °C y 8 °C.

Normalización y agrupación de bibliotecas

Consumibles

- ▶ Tubo cónico de 15 ml
- ▶ Placa de PCR de 96 pocillos
- ▶ Tubos de microcentrifugado
- ▶ Bolas de biblioteca
- ▶ Tampón de dilución de biblioteca
- ▶ Diluyente de normalización de bibliotecas
- ▶ Lavado de normalización de bibliotecas
- ▶ NaOH 10 N
- ▶ Agua sin ARNasa ni ADNasa

Preparación

- 1 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Bolas de biblioteca	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.
Tampón de dilución de biblioteca	Entre -25 °C y -15 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente. Agite con fuerza. Asegúrese de que se hayan disuelto todos los precipitados.
Diluyente de normalización de bibliotecas	Entre -25 °C y -15 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente. Agite con fuerza. Asegúrese de que se han disuelto todos los precipitados.
Lavado de normalización de bibliotecas	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente. Agite con fuerza.

- 2 Prepare NaOH 0,1 N nuevo añadiendo 50 µl de NaOH 10 N a 4950 µl de agua sin ARNasa ni ADNasa.

Procedimiento

- 1 Mezcle diluyente de normalización de bibliotecas y bolas de biblioteca en un tubo cónico de 15 ml del siguiente modo.



NOTA

Entre las siguientes instrucciones, se incluyen los volúmenes necesarios para procesar 96 muestras. Si se procesan menos muestras, ajuste los volúmenes de forma pertinente para preservar los reactivos.

- a En el caso de 96 muestras, añada 4,4 ml de diluyente de normalización de bibliotecas.
- b Agite enérgicamente en un mezclador vorticial las bolas de biblioteca durante un minuto invirtiéndolas de manera intermitente hasta que las bolas se resuspendan y no quede sedimento en el fondo del tubo cuando este se invierta.
- c Pipetee las bolas de bibliotecas arriba y abajo 10 veces para resuspender.



PRECAUCIÓN

Resulta muy importante resuspender completamente el pellet de bolas de la biblioteca del fondo del tubo. Si utiliza una P1000, asegúrese de que las bolas quedan resuspendidas de manera homogénea y de que no queda masa de bolas en el fondo del tubo. Esto resulta fundamental para lograr una densidad de grupos coherente en la celda de flujo.

- d En el caso de 96 muestras, pipetee 800 μ l de bolas de biblioteca en el tubo cónico que contiene el diluyente de normalización de bibliotecas.
 - e Dé la vuelta al tubo de 15 a 20 veces para mezclarlo.
- 2 Añada 45 μ l de la solución de trabajo de diluyente de normalización de bibliotecas/bolas de biblioteca en cada pocillo de la placa LNP.
 - 3 Selle la placa LNP y agítela en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante 30 minutos.



NOTA

Si va a continuar con la secuenciación el mismo día, empiece a descongelar el cartucho de reactivo. Siga las instrucciones para descongelar el cartucho de reactivo de MiSeqDx en la sección titulada *Preparación para la secuenciación de bibliotecas en la página 33.*

- 4 Coloque la placa LNP en el soporte magnético y espere a que el líquido sea transparente (aproximadamente 2 minutos).
- 5 Con la placa LNP en el soporte magnético, extraiga y deseche con cuidado el sobrenadante.
- 6 Retire la placa LNP del soporte magnético y lave las bolas con lavado de normalización de bibliotecas como se indica a continuación:
 - a Añada 45 μ l de lavado de normalización de bibliotecas en cada pocillo de muestra.
 - b Selle la placa LNP y agítela en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante 5 minutos.
 - c Coloque la placa en el soporte magnético durante un mínimo de dos minutos o hasta que el sobrenadante se distinga con claridad.
 - d Extraiga y deseche con cuidado el sobrenadante.
- 7 Repita el procedimiento de lavado de normalización de bibliotecas tal y como se describe en el paso anterior.
- 8 Utilice una pipeta multicanal P20 con configuración de pipeteo a 20 μ l para extraer el exceso de lavado de normalización de bibliotecas.
- 9 Retire la placa LNP del soporte magnético y añada 30 μ l de NaOH 0,1 N a cada pocillo.
- 10 Selle la placa LNP y agítela en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante 5 minutos.
- 11 Durante los cinco minutos de elución, asigne la etiqueta SGP a una nueva placa de PCR de 96 pocillos.
- 12 Añada 30 μ l de tampón de almacenamiento de biblioteca a cada pocillo que se debe utilizar en la placa SGP.
- 13 Asegúrese de que todas las muestras de la placa LNP estén resuspendidas por completo. Si las muestras no están completamente resuspendidas, pipetee con cuidado las muestras arriba y abajo o golpee ligeramente la placa contra la mesa y, a continuación, agite cinco minutos más.
- 14 Coloque la placa LNP en el soporte magnético durante dos minutos como mínimo.
- 15 Con una pipeta multicanal con configuración de pipeteo a 30 μ l, transfiera el sobrenadante de la placa LNP a la placa SGP. Pipetee con cuidado arriba y abajo cinco veces para mezclar.
- 16 Selle la placa SGP y centrifugue a 1000 \times g a una temperatura de 20 °C durante un minuto.
- 17 Agite el tampón de dilución de biblioteca en un mezclador vorticial y asegúrese de que todos los precipitados se hayan disuelto por completo. Centrifugue brevemente para recoger el contenido.
- 18 Asigne a un nuevo tubo de microcentrifugado la etiqueta PAL.

- 19 Determine las muestras que se deben agrupar para la secuenciación. Es posible agrupar un máximo de 96 muestras para su secuenciación.
- 20 Transfiera 5 µl de cada biblioteca que se deba secuenciar de la placa SGP, columna por columna, al pocillo correspondiente de una gradilla de ocho tubos de PCR.
- 21 Transfiera el contenido de la gradilla de ocho tubos de PCR al tubo PAL. Agite el tubo PAL hasta que se haya mezclado por completo.
- 22 Selle la placa SGP con un sello adhesivo para placas y colóquelo una etiqueta con el nombre y la fecha del experimento.



NOTA

La placa SGP puede almacenarse a entre -25 °C y -15 °C hasta 3 días y utilizarse para reagrupar bibliotecas si es necesario.

- 23 Asigne a dos o tres nuevos tubos de microcentrifugado la etiqueta PAL.
- 24 Añada 585 µl de tampón de dilución de biblioteca a los tubos DAL.
- 25 Transfiera 9 µl de PAL a cada tubo DAL que contenga tampón de dilución de biblioteca.
- 26 Pipetee arriba y abajo entre tres y cinco veces para enjuagar la punta y garantizar que se complete la transferencia.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si no va a continuar inmediatamente con la secuenciación en el MiSeqDx, los tubos DAL se pueden almacenar a entre -25 °C y -15 °C durante un máximo de 28 días.

Secuenciación de bibliotecas



NOTA

El flujo de trabajo de secuenciación de bibliotecas del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística y del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística es idéntico.

Preparación para la secuenciación de bibliotecas

Consumibles

- ▶ Kit de reactivos MiSeqDx v. 3
- ▶ Tampón de dilución de biblioteca
- ▶ Biblioteca del control interno PhiX

Preparación

- 1 Caliente un bloque de calor apto para tubos de centrifugado de 1,5 ml a 96 °C.
- 2 En una hielera, prepare un baño de agua con hielo.
- 3 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Tampón de dilución de biblioteca	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar. Asegúrese de que se han disuelto todos los precipitados. Centrifugue brevemente y coloque en un baño de agua con hielo. Si es necesario, se proporciona una tampón de dilución de biblioteca adicional con el kit de reactivos MiSeqDx v. 3.
Control interno PhiX	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Coloque en un baño de agua con hielo.

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Cartucho del kit de reactivos MiSeqDx v. 3	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele el cartucho de reactivo en el baño de agua a temperatura ambiente durante aproximadamente 90 minutos o hasta que esté totalmente descongelado. Para obtener más información sobre la preparación de cartuchos de reactivos, consulte la Guía de referencia del instrumento MiSeqDx para MOS v. 2 (n.º de documento 1000000021961).
Celda de flujo MiSeqDx	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente. Para obtener más información sobre la preparación de la celda de flujo, consulte la Guía de referencia del instrumento MiSeqDx para MOS v. 2 (n.º de documento 1000000021961).
Solución SBS de MiSeqDx (PR2)	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente. Para obtener más información sobre la preparación de la solución SBS, consulte la Guía de referencia del instrumento MiSeqDx para MOS v. 2 (n.º de documento 1000000021961).

Desnaturalización y dilución del control interno PhiX

Consumibles

- ▶ Agua sin ARNasa ni ADNasa
- ▶ NaOH 10 N
- ▶ Tampón de dilución de biblioteca
- ▶ Biblioteca del control interno PhiX
- ▶ Tampón de TE
- ▶ Tubo cónico de 15 ml
- ▶ Tubos de microcentrifugado

Preparación

- 1 En un tubo cónico, combine los siguientes volúmenes para preparar NaOH 0,1 N:
 - ▶ Agua sin ARNasa ni ADNasa (2475 µl)
 - ▶ Preparado de NaOH 10 N (25 µl)
- 2 Invierta el tubo varias veces para mezclar.



PRECAUCIÓN

El uso de NaOH recién diluido es esencial para desnaturalizar completamente las muestras para la generación de grupos en el sistema MiSeqDx.

Si el PhiX se prepara el mismo día que la normalización de bibliotecas, se puede usar el mismo preparado de NaOH 0,1 N.

- 3 Combine los siguientes volúmenes para diluir la biblioteca de control interno PhiX a 2 nM:
 - ▶ Biblioteca de control interno PhiX a 10 nM (2 µl)
 - ▶ Tampón TE de 1× (8 µl)
- 4 Combine los siguientes volúmenes para preparar una biblioteca del control interno PhiX a 1 nM:
 - ▶ Biblioteca de control interno PhiX 2 nM (10 µl)
 - ▶ NaOH 0,1 N (10 µl)
- 5 Agite en vórtice brevemente para mezclar.
- 6 Centrifugue el control interno PhiX de 1 nM a 280 × g a 20 °C durante un minuto.
- 7 Incube durante cinco minutos a temperatura ambiente para desnaturalizar la solución de la biblioteca del control interno PhiX en cadenas simples.

- 8 En un tubo de microcentrifugado, combine los siguientes volúmenes en un tubo de microcentrifugado para preparar una biblioteca de control interno PhiX de 20 pM:
 - ▶ Biblioteca de control interno PhiX desnaturalizada (2 µl)
 - ▶ Tampón de dilución de biblioteca enfriado previamente (98 µl)



PRECAUCIÓN

La biblioteca de control interno PhiX desnaturalizada de 20 pM se puede almacenar hasta tres semanas a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C como partes alícuotas de un solo uso.

Preparación de muestras para secuenciación

- 1 Utilice un tubo DAL para la secuenciación.
- 2 Si el tubo DAL estaba almacenado congelado, descongélelo por completo y mézclelo pipeteando arriba y abajo.
- 3 Si el control interno PhiX de 20 pM se ha almacenado congelado, extraiga las alícuotas de un solo uso, descongélelo por completo, mézclelo con un vórtice y centrifugue brevemente.
- 4 Añada 6 µl de control interno PhiX de 20 pM al tubo DAL.
- 5 Pipetee arriba y abajo entre tres y cinco veces para enjuagar la punta y garantizar que se complete la transferencia.
- 6 Mezcle el tubo DAL agitándolo en el mezclador vorticial a máxima velocidad.
- 7 Centrifugue el tubo DAL a $1000 \times g$ a 20 °C durante un minuto.
- 8 Incube el tubo DAL en un termobloque a 96 °C durante dos minutos.
- 9 Tras la incubación, invierta el tubo DAL una o dos veces para mezclar y, a continuación, colóquelo inmediatamente en el baño de agua con hielo.
- 10 Mantenga el tubo DAL (bibliotecas agrupadas) en el baño de agua con hielo durante 5 minutos.

Carga de bibliotecas agrupadas en cartuchos

- 1 Utilice una nueva punta de pipeta de 1 ml para perforar el cierre metálico situado por encima del depósito del cartucho de reactivo etiquetado como Load Samples (Carga de muestras).
- 2 Pipetee 600 µl del tubo DAL al depósito Load Samples (Carga de muestras). Evite tocar el sello metálico.
- 3 Compruebe la presencia de burbujas de aire en el depósito tras la carga de muestras. En caso de que haya burbujas de aire, golpee suavemente el cartucho sobre la mesa para eliminar las burbujas.
- 4 Continúe directamente con los pasos de configuración del experimento mediante la interfaz del MiSeq Operating Software (MOS). Para obtener más información sobre la configuración del experimento en el MiSeqDx, consulte la *Guía de referencia del instrumento MiSeqDx para MOS v. 2 (n.º de documento 100000021961)*.

Lavado posterior al experimento con un lavado del conducto de cadena molde

Tras la secuenciación, se recomienda encarecidamente llevar a cabo un lavado posterior al experimento con lavado del conducto de cadena molde.



PRECAUCIÓN

Si no se lleva a cabo el lavado de conducto de cadena molde, los índices de llamada de control negativo podrían afectar al siguiente experimento.



NOTA

El flujo de trabajo del lavado posterior al experimento del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística y del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística es el mismo.

Consumibles

- ▶ Tubos de microcentrifugado
- ▶ Agua de laboratorio
- ▶ Tween 20
- ▶ Hipocloruro sódico al 5 %
- ▶ Tubo MiSeq



ADVERTENCIA

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

Preparación

- 1 Prepare una solución de lavado nueva con Tween 20 y agua de laboratorio, como se explica a continuación.
 - a Añada 5 ml de Tween 20 al 100 % a 45 ml de agua de laboratorio. Estos volúmenes proporcionan un resultado de Tween 20 al 10 %.
 - b Añada 25 ml de Tween 20 al 10 % a 475 ml de agua de laboratorio. Estos volúmenes proporcionan como resultado una solución de lavado de Tween 20 al 0,5 %.
 - c Invierta cinco veces para mezclar.
- 2 Prepare una solución de lavado fresca con hipoclorito de sodio y agua de laboratorio tal como se explica a continuación.
 - a Añada 36 µl de hipoclorito de sodio al 5 % a 864 µl de agua de laboratorio. Estos volúmenes dan lugar a una dilución 1:25 de hipoclorito de sodio.
 - b Añada 50 µl de la dilución 1:25 de hipoclorito de sodio a 950 µl de agua de laboratorio en un tubo MiSeq.
- 3 Es importante utilizar la concentración correcta de hipoclorito de sodio. Asegúrese de que comprueba el porcentaje de hipoclorito de sodio que aparece en la etiqueta del producto. Si la concentración es demasiado elevada, puede provocar errores en la generación de grupos en experimentos posteriores. Si no se dispone de hipoclorito de sodio al 5 %, elabore una solución de 1 ml de hipoclorito de sodio al 0,01 % en agua de laboratorio. No utilice hipoclorito de sodio para un lavado de mantenimiento o para un lavado en modo en espera.
- 4 Prepare los componentes del lavado con solución de lavado nueva de la siguiente forma.
 - a Añada 6 ml de solución de lavado a cada depósito de la bandeja de lavado.
 - b Añada 350 ml de solución de lavado a la botella de lavado de 500 ml.

Procedimiento

- 1 Inserte el tubo MiSeq con la solución de lavado de hipoclorito de sodio al 0,01 % en la posición 17 de la bandeja de lavado hasta que el cuello del tubo esté alineado con la bandeja.
El tubo desplazará la solución de lavado con Tween 20 y agua de laboratorio de la posición 17.

Figura 2 Tubo MiSeq en la posición 17 de la bandeja de lavado

**PRECAUCIÓN**

Asegúrese de insertar el tubo MiSeq con hipoclorito de sodio solo en la posición 17 de la bandeja. Si inserta el tubo en otra posición, puede provocar fallos en la generación de grupos de los experimentos siguientes.

- 2 Una vez finalizado el experimento, seleccione **Start Wash** (Iniciar lavado). El software eleva automáticamente los dispensadores del refrigerador de reactivos.
- 3 Seleccione la opción **Perform optional template line wash** (Realizar lavado opcional de conducto de cadena molde) en la pantalla Post-Run Wash (Lavado posterior al experimento).
- 4 Abra la puerta del refrigerador de reactivos y del compartimento de reactivos y extraiga el cartucho de reactivo utilizado del refrigerador.
- 5 Introduzca la bandeja de lavado en el refrigerador de reactivos hasta que llegue al tope y, a continuación, cierre la puerta del refrigerador de reactivos.
- 6 Levante el mango del dispensador que se encuentra delante de la botella de solución SBS de MiSeqDx y de la botella de residuos hasta que se quede fijo en su sitio.
- 7 Retire la botella de solución SBS de MiSeqDx y sustitúyala por la botella de lavado.
- 8 Quite la botella de residuos y deseche el contenido de manera adecuada. Devuelva la botella de residuos al compartimento de reactivos.
- 9 Baje lentamente el mango del dispensador. Asegúrese de que los dispensadores bajan a las botellas de lavado y de residuos.
- 10 Cierre la puerta del compartimento de reactivos.
- 11 Seleccione **Next** (Siguiendo). Comenzará el lavado posterior al experimento.
- 12 Cuando el lavado haya finalizado, deje en el instrumento la celda de flujo, la bandeja de lavado y la botella de lavado con la solución de lavado sobrante.
- 13 Los dispensadores permanecen en posición bajada, que es lo normal. Deje la solución de lavado sin utilizar en la bandeja de lavado y en la botella de lavado para evitar que los dispensadores se sequen y que entre aire en el sistema.

Repetición de análisis de bibliotecas secuenciadas

Tras un experimento de secuenciación, se puede repetir el análisis del mismo conjunto de datos de secuenciación siguiendo el procedimiento de *puesta de un análisis en cola por segunda vez* de la *guía de referencia del software Local Run Manager para MiSeqDx* (n.º de documento 1000000011880). La puesta de un análisis en cola por segunda vez se limita al módulo utilizado en principio para realizar la secuenciación. La puesta de un análisis en cola por segunda vez permitirá editar la información de las muestras y generar nuevos informes.



NOTA

Las bibliotecas agrupadas utilizadas para la secuenciación deben tener entre 24 y 96 muestras. Los informes de un subconjunto de muestras se pueden obtener introduciendo menos muestras durante la configuración de la segunda puesta en cola. Los informes solo se generarán para las muestras introducidas durante la configuración de la segunda puesta en cola.

Opciones de repetición de pruebas para las bibliotecas agrupadas

El ensayo de 139 variantes de fibrosis quística TruSight utiliza los mismos reactivos y el mismo flujo de trabajo de preparación de bibliotecas que el ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística TruSight. Antes de iniciar el procedimiento de preparación de bibliotecas, se debe seleccionar un ensayo. Sin embargo, en los casos en los que las bibliotecas agrupadas (tubos DAL) requieren pruebas adicionales (por ejemplo, repetir un experimento de secuenciación o pruebas secundarias con otro ensayo de FQ TruSight), se pueden usar tubos DAL según sea necesario sin tener que repetir la preparación de bibliotecas. Para volver a realizar la prueba, siga este procedimiento:



NOTA

Las bibliotecas agrupadas utilizadas para la secuenciación deben tener entre 24 y 96 muestras como mínimo. Los informes de un subconjunto de muestras se pueden obtener introduciendo menos muestras durante la configuración del experimento de secuenciación. Se secuenciarán todas las muestras indexadas, pero solo se generarán informes de las muestras introducidas durante la configuración del experimento de secuenciación.

- 1 Configure el experimento con las instrucciones de *Selección del ensayo y configuración del experimento en la página 21*.
- 2 Secuencie las bibliotecas con las instrucciones de *Secuenciación de bibliotecas en la página 33*.
- 3 Una vez finalizado el experimento de secuenciación, lave MiSeqDx siguiendo las instrucciones de *Lavado posterior al experimento con un lavado del conducto de cadena molde en la página 35*.

Interpretación de resultados del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística

- ▶ El ensayo de 139 variantes de fibrosis quística se ha diseñado para la detección de 139 variantes de CFTR, incluidas las recomendadas por la ACMG (*Tabla 2*).
- ▶ El informe del ensayo enumera el genotipo y los nombres de las muestras de cada variante detectada para una muestra.
 - ▶ Se analizan todas las muestras para detectar 134 variantes causantes de la fibrosis quística y la variante R117H recomendada por la ACMG. En el informe del ensayo, solo se incluyen los alelos mutantes detectados.
 - ▶ La variante Poli-TG/Poli-T figura únicamente si se identifica la variación R117H para una muestra. En el caso de los pacientes con una variante R117H, se deben realizar pruebas adicionales para determinar si una variante Poli-TG/Poli-T, que podría afectar al fenotipo clínico (por ejemplo, 12-13[TG] o 5T), se encuentra en orientación cis-trans respecto de la variante R117H.



NOTA

El genotipo de Poli-TG/Poli-T se determina con el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística en función del recuento de lecturas de los genotipos más habituales. Debido a la naturaleza digital de la secuenciación de próxima generación, el ensayo puede alcanzar una gran precisión a partir de varias observaciones en comparación con otras tecnologías basadas en secuenciación que solo se valen de un número escaso de observaciones.

- ▶ Cuando una muestra contiene genotipos de F508del o I507del homocigóticos, si se detecta, al menos, uno de los tres polimorfismos benignos I506V, I507V o F508C, se notifica para la muestra. Si los tres polimorfismos benignos son de estado natural, el informe indica que no se encuentran las variantes I506V, I507V y F508C para la muestra.



NOTA

Dado que este es un ensayo basado en secuenciación, no se producen interferencias en la descripción de F508del o I507del debido a los tres polimorfismos benignos. Por lo tanto, no se realizarán correcciones en el resultado obtenido.

- ▶ Cuando se identifica una muestra como heterocigótica y se detectan alelos mutantes y en estado natural para la muestra, el resultado del genotipo es HET.
- ▶ Cuando se identifica una muestra como homocigótica y solo se detecta el alelo mutante para la muestra, el resultado del genotipo es HOM.
- ▶ Si no se detecta ninguna variante para una muestra, el informe indica No panel variants are detected (No se han detectado variantes del panel).
- ▶ El informe del ensayo proporciona información sobre los índices de llamada de muestras para cada muestra. El índice de llamada se calcula dividiendo el número de regiones/posiciones de variantes que satisfacen un umbral de valor de confianza predefinido entre las regiones/posiciones totales analizadas.
 - ▶ En el caso de las muestras que requieren una descripción secundaria, las variantes adicionales analizadas también se tienen en cuenta en el cálculo del índice de llamada.
 - ▶ Cualquier variante con un valor de confianza predefinido por debajo del umbral se notifica como No Call (Ausencia de llamada). Se recomienda volver a repetir la muestra.
- ▶ El resultado de una muestra solamente se considera válido si el índice de llamada es igual o superior al 99 %. Si el índice de llamada es inferior al 99 %, el resultado será Fail (No apto) y la muestra se tendrá que repetir.



NOTA:

Si el índice de llamada de la muestra es inferior al 50 %, el resultado será Fail (No apto) y se incluirá el comentario Sample Failed (Muestra no apta) en el informe. No se mostrará la información de las variantes. Esta muestra se deberá repetir.

- ▶ Se recomienda que el usuario verifique las variantes que se validaron con muestras sintéticas (consulte la tabla de precisión) con un método de referencia validado antes de notificar el primer resultado del paciente con dichas variantes.
- ▶ Si se identifican más de dos variantes para una muestra, se recomienda que el usuario verifique el resultado repitiendo la muestra con el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística TruSight utilizando una extracción nueva de ADNg para descartar la contaminación cruzada de la muestra.



NOTA

Se debe tener en cuenta la ordenación de haplotipos cuando se detectan dos o más variantes.

- ▶ Todas las interpretaciones de las variantes las debe realizar un genetista molecular clínico certificado o equivalente de acuerdo con los procedimientos y las directrices locales.¹⁵ Entre las posibles referencias de interpretación se incluyen, entre otras, las siguientes: base de datos de CFTR2,¹¹ artículo de Sosnay¹³ directrices de la ACMG de 2004¹ y la opinión del comité ACOG de 2011.² Si desea obtener información sobre el cálculo y la presentación de los resultados, o si desea obtener una descripción del contenido del informe del archivo de texto, consulte las guías del software de análisis instalado con el MiSeqDx. Con respecto a Local Run Manager, consulte la *Guía de referencia del software Local Run Manager para MiSeqDx (n.º de documento 100000011880)* y la *Guía de flujo de trabajo del módulo de análisis de 139 variantes de fibrosis quística 2.0 de Local Run Manager (n.º de documento 1000000100945)*.

Interpretación de resultados del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística

El ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística se ha diseñado para secuenciar todas las regiones de codificación del gen CFTR en los 27 exones, entre 5 y 30 bases de secuencia intrónica adyacente, aproximadamente 100 nt de secuencia adyacente en las regiones no traducidas 5' y 3', y dos mutaciones intrónicas profundas (1811+1,6kbA>G, 3489+10kbC>T). Las regiones secuenciadas exactas figuran en la [Tabla 3](#). Asimismo, el ensayo notifica acerca de la variante Poli-TG/Poli-T y dos deleciones de gran tamaño (CFTRdele2,3 y CFTRdele22,23).

- ▶ El informe del ensayo enumera el genotipo y los nombres de las muestras de cada variante detectada para una muestra.
 - ▶ La coordenada genómica, el nombre de ADNC de la sociedad de variación del genoma humano (Human Genome Variation Society [HGVS]) y el nombre de la proteína (si estuviera disponible) se notifican para cada variante.
 - ▶ El tipo de variante se identifica como variante de nucleótido único (SNV), variante de delección/inserción (DIV), variante Poli-TG/Poli-T (Poli-TG/Poli-T) o delección de gran tamaño (DEL).
 - ▶ La llamada de genotipo, tanto heterocigótico como homocigótico, se puede deducir de la información de la base de referencia, que proporciona la secuencia de referencia en dicha coordenada genómica, y de la descripción del resultado, que proporciona los dos alelos de la posición genómica en la muestra. Por ejemplo, si la referencia es G y el resultado es A/G, esto indica un cambio G>A en dicha coordenada genómica y que el genotipo es heterocigótico para el alelo de la variante. Del mismo modo, si la referencia es G y el resultado es T/T, esto indica un cambio G>T en dicha coordenada genómica y que el genotipo es homocigótico para el alelo de la variante.
 - ▶ La profundidad de la secuenciación en la posición de la variante se proporciona en el campo Depth (Profundidad) y la frecuencia alélica en la sección Frequency (Frecuencia).
- ▶ El informe del ensayo proporciona información sobre los índices de llamada de muestras para cada muestra. El índice de llamada se calcula dividiendo el número de regiones/posiciones de variantes que satisfacen un umbral de valor de confianza predefinido entre las regiones/posiciones totales analizadas.
 - ▶ La coordenada genómica de cualquier posición o región cuyo valor de confianza se encuentra por debajo del umbral se enumera de forma independiente en la sección Coordinates not called (Coordenadas no llamadas). Los usuarios deben evaluar las posiciones no llamadas con información relevante sobre las variantes para identificar variantes que es posible que no se hayan identificado y sus frecuencias de población correspondientes con el fin de determinar si se debe repetir la muestra.
- ▶ El resultado de una muestra solamente se considera válido si el índice de llamada es igual o superior al 99 %. Si el índice de llamada es inferior al 99 %, el resultado será Fail (No apto) y la muestra se tendrá que repetir.
- ▶ Se recomienda que el usuario verifique las variantes que no se encuentren en lo que se valida en el estudio de precisión (consulte [Exactitud en la página 61](#)) con un método de referencia validado antes de notificar el primer resultado del paciente con dichas variantes.



NOTA

Se debe tener en cuenta la ordenación de haplotipos cuando se detectan dos o más variantes.

- ▶ Todas las interpretaciones de las variantes las debe realizar un genetista molecular clínico certificado o equivalente de acuerdo con los procedimientos y las directrices locales.¹⁵ Entre las posibles referencias de interpretación se incluyen, entre otras, las siguientes: base de datos de CFTR^{21,12}, artículo de Sosnay¹³, directrices de la ACMG de 2004¹ y la opinión del comité ACOG de 2011.² Para obtener información acerca de cómo se calculan y presentan los resultados o consultar una descripción del contenido del informe del archivo de texto, consulte las guías del software de análisis instalado en el MiSeqDx. Con Local Run Manager, consulte la *Guía de referencia del software Local Run Manager para MiSeqDx (n.º de documento 100000011880)* y la *Guía de flujo de trabajo del módulo de análisis de secuenciación clínica de fibrosis quística 2.0 de Local Run Manager (n.º de documento 100000100946)*.

- ▶ El genetista utilizará el software Local Run Manager para introducir un valor de interpretación de cada variante notificada en una muestra mediante un menú desplegable. Las opciones de valores de interpretación son: causante de la fibrosis quística, mutación de consecuencia clínica variable, mutación de relevancia desconocida o no causante de la fibrosis quística. El valor introducido se incluirá en el archivo de resultados y se mostrará en la columna de interpretación del informe del ensayo de secuenciación clínica.

Procedimientos de control de calidad

Las prácticas recomendadas de laboratorio dictan que se debe evaluar el material de control para detectar diferencias en el procesamiento de la sangre y los procedimientos técnicos en el laboratorio del usuario que podrían conllevar una variabilidad significativa en los resultados.

- **Control negativo (NTC o control sin cadena molde):** Hace falta usar un control negativo en cada experimento para detectar posibles casos de contaminación. El índice de llamada correspondiente al control negativo debe ser inferior al 10 %. Si un control negativo genera un índice de llamada superior al 10 % y si se ha realizado un lavado del conducto de cadena molde para el experimento anterior, es posible que se haya producido contaminación durante el procesamiento del ensayo. El ensayo se considera erróneo y, por lo tanto, se debe repetir el ensayo completo desde la preparación de bibliotecas. La muestra de control negativo se notifica como "Pass" (Apta) si genera un índice de llamada igual o inferior al 10 % y como "Fail" (No apta) si el índice es superior al 10 %.



NOTA

Es fundamental realizar un lavado de conducto de cadena molde después de cada experimento de secuenciación para evitar un índice de llamada elevado de control negativo. Si el índice de llamada de control negativo es superior al 10 % y no se realizó un lavado de conducto de cadena de molde en el experimento anterior, se recomienda que el operador realice un lavado posterior al experimento que incluya el lavado del conducto de la cadena molde y que repita el experimento de secuenciación.

- **Controles positivos:** Se requiere una muestra de ADN de control positivo en cada experimento. La muestra de ADN de control positivo debe contar con unas características bien definidas con al menos una variante de CFTR conocida.¹⁶ Illumina recomienda el uso de controles positivos rotatorios de acuerdo con las directrices y normativas técnicas de 2008 de la ACMG para las pruebas de mutación de la fibrosis quística¹⁷ y las normativas de los laboratorios clínicos de 2013 de la ACMG para la secuenciación de próxima generación.¹⁸ La muestra de control positivo debe generar el genotipo previsto. Si el control positivo genera un genotipo distinto al previsto, es posible que se haya producido un error en el seguimiento de las muestras o que los cebadores de índice se hayan registrado de forma incorrecta. Se debe repetir el ensayo completo desde la preparación de bibliotecas. La muestra de control positivo se notifica como "Pass" (Apta) si genera un índice de llamada igual o superior al 99 % y como "Fail" (No apta) si el índice es inferior al 99 %.
- **Control natural:** Se recomienda una muestra de control de ADN sin mutaciones (natural) en todos los experimentos. La muestra de control salvaje debe ser una muestra con características bien definidas que no contenga ninguna variante de CFTR. La muestra de control sin mutaciones debe generar el genotipo previsto. Si el control salvaje genera un genotipo distinto al previsto, es posible que se haya producido un error en el seguimiento de las muestras o que los cebadores de índice se hayan registrado de forma incorrecta. Se debe repetir el ensayo completo desde la preparación de bibliotecas.
- El resultado de una muestra solamente se considera válido si el índice de llamada es igual o superior al 99 %. Si el índice de llamada es inferior al 99 %, el resultado será Fail (No apto) y la muestra se tendrá que repetir.
- Antes del uso inicial de este producto en el laboratorio del usuario, se debe verificar el rendimiento del ensayo realizando una prueba de varias muestras positivas y negativas con características de rendimiento conocidas.
- Se deben satisfacer todos los requisitos de control de calidad en virtud de la regulación local, estatal o federal, o en virtud de los requisitos de acreditación.

Características de rendimiento del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística

Las características de rendimiento del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística están basadas en estudios que utilizaron el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx. Encontrará la equivalencia entre los ensayos TruSight y MiSeqDx en *Equivalencia de rendimiento con el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina en la página 60.*

Exactitud

La precisión del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística se determinó mediante la evaluación de 500 muestras con representación de una amplia diversidad de variantes de CFTR de cuatro fuentes distintas. La fuente principal de los datos de la precisión fue un estudio de precisión clínica que se llevó a cabo con un panel de 366 muestras. La mayoría de las muestras (n = 355) eran muestras clínicas de ADNg archivadas y anónimas aisladas de sangre humana. Las 11 muestras restantes se obtuvieron a partir de muestras de estirpes celulares comercializadas.

Los datos de este estudio se complementaron con datos de precisión de 68 muestras de estirpes celulares evaluadas en el estudio de reproducibilidad, 14 muestras clínicas del estudio analítico de evaluación de métodos de extracción y 52 muestras de plásmidos sintéticos. Los plásmidos sintéticos se diseñaron para incluir el contexto genómico de las variantes excepcionales y contenían entre una y nueve variantes en la misma construcción. Se linealizaron, se diluyeron con números de copia equivalentes de ADNg y se mezclaron con muestras de ADNg humano de genotipo salvaje en números de copia equivalentes para imitar una muestra heterocigótica.

Los resultados de genotipado correspondientes a 137 posiciones de inserción y deleción de pequeño tamaño y de SNV, incluida la región Poli-TG/Poli-T, se compararon con los análisis de secuenciación bidireccional de Sanger. Se utilizaron dos ensayos basados en PCR validados como método de referencia para las dos deleciones de gran tamaño del panel. En cada ensayo de PCR doble se emplearon dos conjuntos de cebadores para discriminar entre genotipos homocigóticos, heterocigóticos y salvajes. Uno de los conjuntos de cebadores se diseñó para flanquear los valores críticos de deleción, mientras que el otro amplificaba una región interna de la deleción. Los dos productos se detectaron por la separación de tamaño en gel de agarosa.

Los ensayos de PCR se validaron con un panel de 28 muestras (22 muestras por cada deleción) que constaba de muestras de ADN genómico derivado de sangre y estirpes celulares y plásmidos sintéticos, que comprendían los genotipos homocigóticos, heterocigóticos y en estado natural de cada deleción de gran tamaño. Los ensayos de PCR confirmaron una especificidad y reproducibilidad del 100 % para todas las muestras analizadas mediante la evaluación de los productos de PCR en gel de agarosa. La precisión de los ensayos de PCR se confirmó con secuenciación de Sanger y demostró ser del 100 % para todas las muestras.

La precisión para cada genotipo se determinó a través de tres medidas estadísticas. Se calculó la coincidencia positiva de cada genotipo de variante dividiendo el número de muestras con llamadas de variantes coincidentes entre el número total de muestras con esa variante, según se identificó con los métodos de referencia. Se calculó la coincidencia negativa en todas las posiciones de la cepa salvaje dividiendo el número de posiciones de la cepa salvaje coincidentes entre el número total de posiciones, según se identificó con los métodos de referencia. La coincidencia total (OA) se calculó en todas las posiciones conocidas dividiendo el número de posiciones de la cepa salvaje y de las variantes coincidentes entre el número total de posiciones conocidas, tal y como se aclara en los métodos de referencia.

El ensayo de 139 variantes de fibrosis quística arrojó una coincidencia positiva del 100 % en el nivel de genotipo. La coincidencia negativa de todas las posiciones de la cepa salvaje fue superior al 99,99 % y la coincidencia total de todas las posiciones conocidas fue superior al 99,99 %. Los resultados de todas las pruebas se basan en la prueba inicial.

Tabla 14 Precisión global del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Nombre de ADNc	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (sin mutaciones)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas						
CFTR dele2, 3	DEL	c.54-5940_273+10250 del21kb	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
E60X	SNV	c.178G>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
P67L	SNV	c.200C>T	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R75X	SNV	c.223C>T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G85E	SNV	c.254G>A	500	6	2	0	492	0	0	100	100	100
394delTT	DIV	c.262_263 delTT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
406-1G>A	SNV	c.274-1G>A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
E92X	SNV	c.274G>T	500	0	1	1	498	0	0	100	100	100
D110H	SNV	c.328G>C	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R117C	SNV	c.349C>T	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
R117H	SNV	c.350G>A	500	17	2	0	481	0	0	100	100	100
Y122X	SNV	c.366T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
621+1G>T	SNV	c.489+1G>T	500	7	5	0	488	0	0	100	100	100
663delT	DIV	c.531 delT	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
G178R	SNV	c.532G>A	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
711+1G>T	SNV	c.579+1G>T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
P205S*	SNV	c.613C>T	500	1	0	1	498	0	0	100*	100	100
L206W	SNV	c.617T>G	500	8	1	0	491	0	0	100	100	100
1078delT	DIV	c.948delT	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
G330X	SNV	c.988G>T	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R334W	SNV	c.1000C>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
I336K	SNV	c.1007T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Nombre de ADNc	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (sin mutaciones)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas						
1154insTC	DIV	c.1022_1023 insTC	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R347H	SNV	c.1040G>A	500	6	1	1	492	0	0	100	100	100
R347P	SNV	c.1040G>C	500	3	2	0	495	0	0	100	100	100
R352Q	SNV	c.1055G>A	500	5	0	0	495	0	0	100	100	100
A455E	SNV	c.1364C>A	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
S466X(C>G)	SNV	c.1397C>G	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
1548delG	DIV	c.1418delG	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
Q493X	SNV	c.1477C>T	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
I507del	DIV	c.1519_1521 delATC	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
F508del	DIV	c.1521_1523 delCTT	500	84	29	0	387	0	0	100	100	100
1677delTA	DIV	c.1545_1546 delTA	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
V520F	SNV	c.1558G>T	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
1717-1G>A	SNV	c.1585-1G>A	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
G542X	SNV	c.1624G>T	500	12	3	0	485	0	0	100	100	100
S549N	SNV	c.1646G>A	500	2	2	1	495	0	0	100	100	100
S549R (c.1647T>G)	SNV	c.1647T>G	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G551D	SNV	c.1652G>A	500	8	3	0	489	0	0	100	100	100
R553X	SNV	c.1657C>T	500	8	2	0	490	0	0	100	100	100
A559T	SNV	c.1675G>A	500	4	0	1	495	0	0	100	100	100
R560T	SNV	c.1679G>C	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
1812-1 G>A	SNV	c.1680-1G>A	500	0	2	0	498	0	0	100	100	100

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Nombre de ADNc	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (sin mutaciones)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas						
1898+1G>A	SNV	c.1766+1G>A	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100
2143delT	DIV	c.2012delT	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100
2183AA>G	DIV	c.2051_2052delAAinsG	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
2184insA	DIV	c.2052_2053insA	500	3	0	1	496	0	0	100	100	100
2184delA	DIV	c.2052delA	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R709X	SNV	c.2125C>T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
K710X	SNV	c.2128A>T	500	3	0	0	497	0	0	100	100	100
2307insA	DIV	c.2175_2176insA	500	3	0	2	495	0	0	100	100	100
R764X	SNV	c.2290C>T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
W846X	SNV	c.2537G>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
2789+5G>A	SNV	c.2657+5G>A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
Q890X	SNV	c.2668C>T	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3120G>A	SNV	c.2988G>A	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3120+1G>A	SNV	c.2988+1G>A	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100
3272-26A>G	SNV	c.3140-26A>G	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R1066C	SNV	c.3196C>T	500	6	0	0	494	0	0	100	100	100
R1066H	SNV	c.3197G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
W1089X	SNV	c.3266G>A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
Y1092X(C>A)	SNV	c.3276C>A	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
M1101K	SNV	c.3302T>A	500	2	2	0	496	0	0	100	100	100
R1158X	SNV	c.3472C>T	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Nombre de ADNc	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (sin mutaciones)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas						
R1162X	SNV	c.3484C>T	500	5	1	0	494	0	0	100	100	100
3659delC	DIV	c.3528delC	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
S1196X	SNV	c.3587C>G	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3791delC	DIV	c.3659delC	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
3849+10kbC>T	SNV	c.3717+12 191C>T	500	11	2	0	487	0	0	100	100	100
3876delA	DIV	c.3744delA	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
S1251N	SNV	c.3752G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
3905insT	DIV	c.3773_3 774insT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
W1282X	SNV	c.3846G>A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
N1303K	SNV	c.3909C>G	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
CFTR dele22,23 [§]	DEL	c.3964-78_ 4242+577del	500	1	0	1	498	1 [§]	0	100	99,80	99,80
M1V	SNV	c.1A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q39X	SNV	c.115C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
405+1 G>A	SNV	c.273+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E92K	SNV	c.274G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q98X	SNV	c.292C>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
457TAT>G	DIV	c.325_327 delTATinsG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
574delA	DIV	c.442delA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
711+3A>G	SNV	c.579+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
711+5 G>A	SNV	c.579+5G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
712-1 G>T	SNV	c.580-1G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
H199Y	SNV	c.595C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Nombre de ADNc	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (sin mutaciones)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas						
Q220X	SNV	c.658C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
852del22	DIV	c.720741 delAGGG AGAAT GATGAT GAAGTAC	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
T338I	SNV	c.1013C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S341P	SNV	c.1021T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1213delT	DIV	c.1081delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1248+1G>A	SNV	c.1116+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1259insA	DIV	c.1127_1 128insA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
W401X (c.1202G>A)	SNV	c.1202G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W401X (c.1203G>A)	SNV	c.1203G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1341+1G>A	SNV	c.1209+1G>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
1461ins4	DIV	c.1329_ 1330ins AGAT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1525-1G>A	SNV	c.1393-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S466X(C>A)	SNV	c.1397C>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L467P	SNV	c.1400T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S489X	SNV	1466C>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
S492F	SNV	c.1475C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q525X	SNV	c.1573C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1717-8G>A	SNV	c.1585-8G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Nombre de ADNc	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (sin mutaciones)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas						
S549R (c.1645A>C)	SNV	c.1645A>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q552X	SNV	c.1654C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R560K	SNV	c.1679G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1811+1,6kbA>G	SNV	c.1679+1,6 kbA>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E585X	SNV	c.1753G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1898+3A>G	SNV	c.1766+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L732X	SNV	c.2195T>G	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2347delG	DIV	c.2215delG	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2585delT	DIV	c.2453delT	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E822X	SNV	c.2464G>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2622+1G>A [¶]	SNV	c.2490+1G>T [¶]	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E831X	SNV	c.2491G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R851X	SNV	c.2551C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
2711delT	DIV	c.2583delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L927P	SNV	c.2780T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S945L	SNV	c.2834C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3007delG	DIV	c.2875delG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G970R	SNV	c.2908G>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3121-1G>A	SNV	c.2989-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1065P	SNV	c.3194T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1077P [^]	SNV	c.3230T>C	500	0	0	1	499	0 [^]	0	100	100	100
Y1092X(C>G)	SNV	c.3276C>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E1104X	SNV	c.3310G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Nombre de ADNc	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (sin mutaciones)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas						
W1204X (c.3611G>A)	SNV	c.3611G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W1204X (c.3612G>A)	SNV	c.3612G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G1244E	SNV	c.3731G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4005+1G>A	SNV	c.3873+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4016insT	DIV	c.3884_3885insT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q1313X	SNV	c.3937C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4209TG TT>AA	DIV	c.4077_4080delT GTTinsAA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4382delA	DIV	c.4251delA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Poli-TG/ Poli-T [€]	Poli-TG/ Poli-T	c.1210-12T[5_9]	19	17	2	0	0	0	0	100	N/A	100
I506V [¥]	SNV	c.1516A>G	1	0	0	0	1	0	0	N/A	100	100
I507V [¥]	SNV	c.1519A>G	1	0	0	0	1	0	0	N/A	100	100
F508C [¥]	SNV	c.1523T>G	1	0	0	0	1	0	0	N/A	100	100
Total			67522		557		66965	1	0	100	> 99,99	> 99,99

DIV es la sigla en inglés de "variante de la delección/inserción".

* El informe de Sanger indicó que, en el caso de la muestra clínica, la variante P205S era heterocigótica. En cambio, una revisión de los datos de rastreo de Sanger indicó que la variante era, en realidad, homocigótica y que se había notificado de forma incorrecta. MiSeqDx notificó que la variante era homocigótica.

§ En el caso de la variante CFTR dele22, 23, se notificó como heterocigótica una muestra heterocigótica sintética para el exón 8. Investigaciones adicionales revelaron que este resultado se debía, posiblemente, a una contaminación de bajo nivel.

^ Se determinó que la muestra sintética heterocigótica original no se había preparado correctamente. Se detectó cuando se realizaron las pruebas posteriores a su preparación utilizando el mismo plásmido.

€ Cuando la R117H es positiva, la variante Poli-TG/Poli-T se notifica de forma adicional.

¥ En el caso de una variante F508del homocigótica, se notificaron de forma adicional tres bases salvajes más (las variantes I506V, I507V y F508C) que no se identificaron en la muestra.

[¶] El estudio de validación original del ensayo incluyó dos muestras sintéticas que contenían el cambio de nucleótido c.2490+1G>T para la variante 2622+1G>A (los datos están incluidos en esta tabla). A continuación, se realizó un segundo estudio de validación con una muestra sintética que contenía el cambio de nucleótido c.2490+1G>A para admitir el cambio de nucleótido real (c.2490+1G>A) asociado con esta variante.

Tabla 15 Precisión del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística para I506V, I507V y F508C

Variante (nombre común)	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (cepa salvaje)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
		Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas						
I506V	500	7	0	0	493	0	0	100	100	100
I507V	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
F508C	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100

Tabla 16 Precisión del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística para las variantes Poli-TG/Poli-T

Genotipo de Poli-TG/Poli-T	N.º de muestras clínicas	N.º de muestras de estirpe celular	N.º de muestras sintéticas	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas*	% Precisión
(TG)9(T)7/(TG)11(T)7	2	0	0	0	1	50
(TG)9(T)9/(TG)10(T)7	1	0	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)9	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	25	8	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	10	1	0	0	1	90,9
(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	7	6	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	3	2	0	0	0	100

Genotipo de Poli-TG/Poli-T	N.º de muestras clínicas	N.º de muestras de estirpe celular	N.º de muestras sintéticas	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas*	% Precisión
(TG)10(T)9/(TG)12(T)7	13	0	0	0	1	92,3
(TG)11(T)5/(TG)11(T)7	6	0	0	1	0	83,3
(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	52	8	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9^	2	1	0	3^	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
Total**		448		4	3	98,44

* No se volvieron a analizar las muestras.

^ Uno de los resultados que no concordaba provenía del estudio de reproducibilidad. El resultado de Poli-TG/Poli-T de la muestra concordaba con las 18 duplicaciones, pero no concordaba con la secuenciación bidireccional de Sanger.

** El recuento total de muestras para la variante Poli-TG/Poli-T es de 448 porque todas las muestras sintéticas (n = 52) se crearon mezclando plásmidos linealizados con una de dos muestras de estirpes celulares, que formaban parte del estudio de reproducibilidad. Dado que la notificación de la variante Poli-TG/Poli-T para estas muestras sintéticas adicionales daría como resultado una notificación excesiva de la variante, se excluyeron las muestras sintéticas de este análisis.

Reproducibilidad

La reproducibilidad del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística se determinó mediante un estudio a ciegas basado en tres centros de ensayo con dos operadores por centro. Todos los operadores de cada centro comprobaron dos paneles bien definidos de 46 muestras cada uno para un total de 810 llamadas por centro. Los paneles contenían una mezcla de ADN genómico de estirpes celulares linfoblastoides con variaciones conocidas en el gen de la *CFTR*, así como sangre desleucocitada con estirpes celulares linfoblastoides con variantes conocidas en el gen de la *CFTR*. Las muestras de sangre se proporcionaron para permitir la incorporación de los pasos de extracción utilizados en la preparación de ADNg que sirve como la entrada principal del flujo de trabajo de ensayo.

El índice de aptitud de las muestras, definido como el número de muestras que superan los criterios de control de calidad en el primer intento, fue del 99,9 %.

La coincidencia positiva en el nivel del genotipo de todas las variantes fue del 99,77 %. La coincidencia negativa de todas las posiciones de cepa salvaje fue del 99,88 % y la coincidencia total de todas las posiciones conocidas fue del 99,88 %. Los resultados de todas las pruebas se basan en la prueba inicial. No se repitió ninguna prueba del estudio de reproducibilidad.

Tabla 17 Reproducibilidad del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística

Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4*	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1*	100	100	100
A	5^	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135^	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9**	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
A	10	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92

Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C ausente	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100

Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	59	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 [§]	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 [§]	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	75 [^]	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 [^]	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 [§]	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 [§]	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Total				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

* La posición de la cepa salvaje correspondiente a la variante N1303K de una duplicación provocó una ausencia de llamada debida a una cobertura insuficiente.

[^] Un duplicado de las muestras 5 y 75 presentó un índice de llamada del 0 %. Una investigación más detallada indica que es posible que no se hayan añadido las muestras a la placa de muestras antes de la preparación de la biblioteca, ya que los volúmenes de muestra que quedaban en los tubos eran coherentes y no se tuvo que eliminar ninguna cantidad de volumen.

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

[§] La posición de la cepa salvaje correspondiente a la variante M1V de una duplicación de cada una de las dos muestras provocó una ausencia de llamada debida a una cobertura insuficiente.

Tabla 18 Información complementaria sobre las variantes del estudio de reproducibilidad

Variación (nombre común)	Tipo de variante	Región del gen de CFTR
Poli-TG/Poli-T	DIV compuesta*	Intrón 9
2183AA>G	DIV compuesta*	Exón 14
CFTR dele2, 3	DEL	Intrón1-Intrón3
1154insTC	DIV*	Exón 8
I507del	DIV*	Exón 11
F508del	DIV*	Exón 11
2143delT	DIV*	Exón 14
3659delC	DIV*	Exón 22
3876delA	DIV*	Exón 23
394delTT	DIV en región homopolimérica*	Exón 3
1078delT	DIV en región homopolimérica*	Exón 8
2184delA	DIV en región homopolimérica*	Exón 14
3905insT	DIV en región homopolimérica*	Exón 23
E60X	SNV	Exón 3
R75X	SNV	Exón 3
G85E	SNV	Exón 3
E92X	SNV	Exón 4
R117H	SNV	Exón 4
Y122X	SNV	Exón 4
621+1G>T	SNV	Intrón 4
G178R	SNV	Exón 5
711+1G>T	SNV	Intrón 5
L206W	SNV	Exón 6
G330X	SNV	Exón 8
R334W	SNV	Exón 8
I336K	SNV	Exón 8
R347P	SNV	Exón 8
R347H	SNV	Exón 8
A455E	SNV	Exón 10
Q493X	SNV	Exón 11
1717-1G>A	SNV	Intrón 11
G542X	SNV	Exón 12
S549N	SNV	Exón 12
S549R (c.1647T>G)	SNV	Exón 12
G551D	SNV	Exón 12
R553X	SNV	Exón 12
R560T	SNV	Exón 12
1812-1 G>A	SNV	Intrón 12

Variación (nombre común)	Tipo de variante	Región del gen de CFTR
1898+1G>A	SNV	Intrón 13
W846X	SNV	Exón 15
2789+5G>A	SNV	Intrón 16
3120+1G>A	SNV	Intrón 18
3272-26A>G	SNV	Intrón 19
Y1092X(C>A)	SNV	Exón 20
M1101K	SNV	Exón 20
R1158X	SNV	Exón 22
R1162X	SNV	Exón 22
3849+10kbC>T	SNV	Intrón 22
W1282X	SNV	Exón 23
N1303K	SNV	Exón 24

*DIV es la sigla en inglés de "variante de la delección/inserción".

Extracción de ADN

Se evaluaron tres métodos de extracción comercializados utilizados con frecuencia (extracción de bolas magnéticas, precipitación por alcohol y aislamiento de la columna de filtrado de silicio) con sangre total anticoagulada con EDTA. En el estudio, se utilizó un total de 14 muestras de sangre únicas que representaban cepas salvajes y tres genotipos mutantes (tres muestras con F508del, una muestra con I506V y una muestra con D110H). Dos operadores diferentes comprobaron independientemente los tres métodos de extracción de ADN. Cada operador llevó a cabo tres experimentos por método de extracción. Cada operador realizó cada una de las extracciones en días diferentes. La concentración de ADN y el índice de A260/A280 de las muestras de ADNg extraídas se determinaron mediante espectrometría. El tamaño de muestras total para cada método de extracción en el estudio fue de 168 (14 muestras, 2 operadores/métodos de extracción, 3 experimentos/operador y 2 duplicados/muestra de ADNg extraída).

Método de extracción	Número de muestras analizadas	Índice de llamada	Exactitud	Índice de muestras del primer paso*
Precipitación por alcohol	168	100 %	100 %	100 %
Aislamiento de la columna de filtrado de silicio	168	100 %	100 %	100 %
Extracción de bolas magnéticas	168	100 %	100 %	100 %

* Porcentaje de muestras con un índice de llamada igual o superior al 99 % en el primer experimento.

Entrada de ADN

El rango de entrada de ADN del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística se evaluó llevando a cabo un estudio de dilución en serie con 14 muestras representativas de ADN que contenían 16 variantes únicas de la fibrosis quística. Cada muestra se evaluó por duplicado en nueve niveles de entrada de ADN que oscilaban entre 1250 ng y 1 ng (1250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng y 1 ng). Para determinar la precisión, se compararon los genotipos de muestras con los datos de secuenciación bidireccional de Sanger y las delecciones se compararon con un ensayo de PCR. Los niveles 1250 ng y 25 ng se establecieron como el límite superior e inferior para la entrada de ADN respectivamente, ya que arrojaron un índice de muestra de primer paso del 95 % o superior, sin llamadas incorrectas (100 % de precisión y de índice de llamada).

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

Los resultados indican que el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística se puede utilizar en el rango de entrada de ADN de 1250 ng a 25 ng para generar resultados precisos.

Sustancias interferentes

Para evaluar el impacto de las sustancias interferentes en el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística, se calificó el rendimiento del ensayo en presencia y ausencia de posibles sustancias interferentes. Se analizaron ocho muestras de sangre total en el estudio, incluidas tres muestras positivas de fibrosis quística con genotipos únicos. Se analizaron cuatro sustancias interferentes endógenas (bilirrubina, colesterol, hemoglobina y triglicéridos) añadiéndolas a las muestras de sangre antes de la extracción de ADN. En la tabla siguiente se muestran los límites de concentración de cada sustancia. Asimismo, para evaluar la interferencia resultante de la extracción de sangre (extracción breve), se añadió EDTA a las muestras de sangre y, para evaluar la interferencia resultante de la preparación de muestras, se añadió el tampón de lavado final del método de aislamiento de la columna de filtrado de silicio al ADN genómico purificado.

El ensayo de 139 variantes de fibrosis quística arrojó un índice de llamada del 100 % con todas las muestras analizadas, así como una reproducibilidad del 100 % en las llamadas de genotipo entre muestras en presencia y ausencia de sustancias interferentes.

Para evaluar el impacto de la interferencia del cebador de índice del multiplexado, se llevó a cabo un estudio de contaminación cruzada con dos muestras, cada una de ellas con genotipos homocigóticos únicos en cuatro posiciones genómicas diferentes, y dos cebadores de índice respectivos. No se observaron cambios en las llamadas de variantes con niveles de contaminación inferiores al 40 %. El genotipo de la muestra pasó a ser heterocigótico cuando los niveles de contaminación eran iguales o superiores al 40 %.

No se observaron interferencias relacionadas con sustancias interferentes exógenas o endógenas.

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

Indexación de muestras

En el marco del ensayo, los cebadores de índice de muestras se utilizan para asignar un código de barras único a cada muestra de ADN, lo que permite agrupar varias muestras en un solo experimento de secuenciación. Se analizó un total de 96 índices de muestras con ocho muestras de ADN únicas para verificar la capacidad del ensayo de realizar una llamada de genotipado coherente para una muestra determinada con combinaciones distintas de cebadores de índice. Cada muestra se comprobó con 12 combinaciones de cebadores de índice distintas. Los resultados de la muestra se compararon con los datos de secuenciación bidireccional de Sanger en relación con todas las posiciones y variantes, excepto dos deleciones grandes, que se confirmaron mediante un ensayo de PCR doble. La reproducibilidad y la precisión registradas fueron del 100 % en todas las combinaciones de cebadores de índice/muestras.

Equivalencia de rendimiento con el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina

El ensayo de 139 variantes de fibrosis quística TruSight (TruSight CF139) utiliza los mismos reactivos y el mismo flujo de trabajo de preparación de bibliotecas que el ensayo de fibrosis quística de MiSeqDx de Illumina (MiSeqDx CF139). TruSight CF139 utiliza el kit de reactivos MiSeqDx v. 3, mientras que MiSeqDx CF139 usa reactivos de secuenciación incluidos con el ensayo. Para demostrar la equivalencia entre TruSight CF139 y MiSeqDx CF139, se compararon los resultados de nueve experimentos de TruSight CF139 con un solo experimento de MiSeqDx CF139 como referencia. Los experimentos de TruSight CF139 se llevaron a cabo a un rendimiento de 96 muestras (el máximo rendimiento de muestras para TruSight CF139) y los de MiSeqDx CF139 a un rendimiento de 48 muestras (el máximo rendimiento de muestras para MiSeqDx CF139). Las fuentes de variabilidad incluidas en los experimentos de TruSight CF139 incluían tres eventos de preparación de bibliotecas (cada uno con un lote único de TruSight Cystic Fibrosis), tres operadores, tres instrumentos MiSeqDx y tres lotes del kit de reactivos MiSeqDx v. 3.

La llamadas de variantes de los experimentos de TruSight CF139 se compararon con las llamadas realizadas por el experimento de MiSeqDx CF139. Se incluyeron 47 muestras únicas en cada experimento de TruSight CF139, con 2 o 3 réplicas por muestra (95 muestras de ADN y 1 NTC por experimento). En el caso del experimento de MiSeqDx CF139, se secuenciaron las mismas 47 muestras como Singleton (47 muestras de ADN + 1 NTC por experimento). El panel de muestras estaba compuesto de muestras de ADN de Coriell extraídas de estirpes celulares inmortalizadas e incluía muestras que representaban cada alelo de las 23 variantes de ACMG, variantes de delección/inserción (incluidas las inserciones y delecciones en regiones homopoliméricas e inserción con delección en la misma región), variantes homocigóticas, variantes heterocigóticas compuestas, una de las delecciones dirigidas de gran tamaño, una variante común de Poli-TG/Poli-T, numerosas variantes de nucleótido único y una muestra sin variantes detectadas. El resumen de resultados por genotipo aparece en la [Tabla 19](#). La concordancia entre ensayos por tipo de variante aparece en la [Tabla 20](#). La coincidencia general total entre ensayos era de >99,99 %.

Tabla 19 Rendimiento de las llamadas de variantes del ensayo de 139 variantes de FQ TruSight en comparación con el ensayo de 139 variantes de FQ MiSeqDx

		Ensayo de 139 variantes de FQ MiSeqDx				Total
		Variante HOM	Variante HET	Estado natural	Ausencia de llamadas	
Ensayo de 139 variantes de FQ TruSight	Variante HOM	87	-	-	-	87
	Variante HET	-	1098	-	-	1098
	Estado natural	-	-	113 889	-	113 889
	Ausencia de llamadas	-	-	-	-	-
	Total	87	1098	113 889	-	115 074

Tabla 20 Rendimiento por tipo de variante del ensayo de 139 variantes de FQ TruSight en comparación con el ensayo de 139 variantes de FQ MiSeqDx

Tipo de variante	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	Concordancia con el ensayo de 139 variantes de FQ MiSeqDx
SNV	672	0	0	100,00 % (672/672)
DEL	18	0	0	100,00 % (18/18)
DIV	495	0	0	100,00 % (495/495)

Tipo de variante	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	Concordancia con el ensayo de 139 variantes de FQ MiSeqDx
Poli-TG/Poli-T	17	1	0	94,44 % (17/18)
Ninguno (estado natural)	113 889	0	0	100,00 % (113 889/113 889)
Total	115 091	1	0	>99,99 % (115 091/115 092)

Se ha observado una sola llamada que no concordaba entre TruSight CF139 y MiSeqDx CF139. La llamada incorrecta en concreto era una variante Poli-TG/Poli-T. La [Tabla 21](#) presenta un resumen de la concordancia Poli-TG/Poli-T. Dado que solo se informa del genotipo de Poli-TG/Poli-T si también se detecta la variante R117H, el conjunto de datos solo incluye llamadas de Poli-TG/Poli-T desde una única fuente de ADN.

Tabla 21 Rendimiento de las llamadas de variantes Poli-TG/Poli-T del ensayo de 139 variantes de FQ TruSight en comparación con el ensayo de 139 variantes de FQ MiSeqDx

	Ensayo de 139 variantes de FQ MiSeqDx				Total
	(TG)12(T)5 / (TG)10(T)9	(TG)12(T)5 / (TG)12(T)5	Ausencia de llamadas		
Ensayo de 139 variantes de FQ TruSight	(TG)12(T)5 / (TG)10(T)9	17	-	-	17
	(TG)12(T)5 / (TG)12(T)5	1	-	-	1
	Ausencia de llamadas	-	-	-	-
	Total	18	-	-	18

Características de rendimiento del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística

Las características de rendimiento del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística están basadas en estudios que utilizaron el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx. Encontrará la equivalencia entre los ensayos TruSight y MiSeqDx en *Equivalencia de rendimiento con el ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina en la página 90.*

Exactitud

La precisión del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística se ha analizado evaluando 500 muestras representativas de una variedad amplia de variantes de CFTR de cuatro fuentes independientes. La fuente principal de los datos de la precisión fue un estudio de precisión clínica que se llevó a cabo con un panel de 366 muestras. La mayoría de las muestras (n = 355) eran muestras clínicas de ADNg archivadas y anónimas aisladas de sangre humana. Las 11 muestras restantes se obtuvieron a partir de muestras de estirpes celulares comercializadas.

Los datos de este estudio se complementaron con datos de precisión de 68 muestras de estirpes celulares evaluadas en el estudio de reproducibilidad, 14 muestras clínicas del estudio analítico de evaluación de métodos de extracción y 52 muestras de plásmidos sintéticos. Los plásmidos sintéticos se diseñaron para incluir el contexto genómico de las variantes excepcionales y contenían entre una y diez variantes en la misma construcción. Se linealizaron, se diluyeron con números de copia equivalentes de ADNg y se mezclaron con muestras de ADNg humano de genotipo salvaje en números de copia equivalentes para imitar una muestra heterocigótica.

Para el ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística, se compararon un total de 5206 posiciones con los métodos de referencia de secuenciación bidireccional de Sanger y las pruebas de PCR. Los resultados de genotipado correspondientes a las posiciones de inserción y deleción de pequeño tamaño y de SNV, incluida la región Poli-TG/Poli-T, se compararon con los análisis de secuenciación bidireccional de Sanger.

Se utilizaron dos ensayos basados en PCR validados como método de referencia para las dos deleciones de gran tamaño del panel. En cada ensayo de PCR doble se emplearon dos conjuntos de cebadores para discriminar entre genotipos homocigóticos, heterocigóticos y salvajes. Uno de los conjuntos de cebadores se diseñó para flanquear los valores críticos de deleción, mientras que el otro amplificaba una región interna de la deleción. Los dos productos se detectaron por la separación de tamaño en gel de agarosa. Los ensayos de PCR se validaron con un panel de 28 muestras en total (22 muestras por cada deleción) que constaba de muestras de ADN genómico derivado de sangre y estirpes celulares y plásmidos sintéticos, que comprendían los genotipos homocigóticos, heterocigóticos y en estado natural de cada deleción de gran tamaño. Los ensayos de PCR confirmaron una especificidad y reproducibilidad del 100 % para todas las muestras analizadas mediante la evaluación de los productos de PCR en gel de agarosa. La precisión de los ensayos de PCR se confirmó con secuenciación de Sanger y demostró ser del 100 % para todas las muestras.

La precisión para cada genotipo se determinó a través de tres medidas estadísticas. Se calculó la coincidencia positiva de cada genotipo de variante dividiendo el número de muestras con llamadas de variantes coincidentes entre el número total de muestras con esa variante, según se identificó con los métodos de referencia. Se calculó la coincidencia negativa en todas las posiciones de la cepa salvaje dividiendo el número de posiciones de la cepa salvaje coincidentes entre el número total de posiciones, según se identificó con los métodos de referencia. La coincidencia total (OA) se calculó en todas las posiciones conocidas dividiendo el número de posiciones de la cepa salvaje y de las variantes coincidentes entre el número total de posiciones conocidas, tal y como se aclara en los métodos de referencia.

El ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística obtuvo una coincidencia positiva en el nivel de genotipo del 99,66 %, incluidas las variantes Poli-TG/Poli-T (del 100 % excluyendo las variantes Poli-TG/Poli-T). La coincidencia negativa de todas las posiciones de la cepa salvaje fue superior al 99,99 % y la coincidencia total de todas las posiciones conocidas fue superior al 99,99 %.

Tabla 22 Precisión general para el ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística

Genotipo (nombre común/ nombre de ADNc/coordenada)	Nombre de ADNc	Tipo de variante	Región del gen CFTR (hg19)	Llamadas positivas (variantes)			Ausencia de llamadas*	Llamadas incorrectas	Coincidencia positiva
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas			
117120141	c.-8G>C^	SNV	Exón 1	25	3	0	0	0	100
117120145	c.-4G>C^	SNV	Exón 1	3	2	0	0	0	100
M1V	c.1A>G	SNV	Exón 1	0	0	1	0	0	100
CFTR dele2, 3	c.54-5940_ 273+10250 del21kb	Del	Intrón 1	4	1	0	0	0	100
R31C	c.91C>T	SNV	Exón 2	3	1	0	0	0	100
Q39X	c.115C>T	SNV	Exón 2	0	0	1	0	0	100
E60X	c.178G>T	SNV	Exón 3	6	1	0	0	0	100
P67L	c.200C>T	SNV	Exón 3	1	0	1	0	0	100
R74W	c.220C>T	SNV	Exón 3	0	2	0	0	0	100
R74Q	c.221G>A	SNV	Exón 3	2	0	0	0	0	100
R75X	c.223C>T	SNV	Exón 3	3	1	0	0	0	100
R75Q	c.224G>A	SNV	Exón 3	20	1	0	0	0	100
G85E	c.254G>A	SNV	Exón 3	6	2	0	0	0	100
394delTT	c.262_263 delTT	DIV	Exón 3	3	1	0	0	0	100
405+1G>A	c.273+1G>A	SNV	Intrón 3	0	0	1	0	0	100
406-1G>A	c.274-1G>A	SNV	Exón 4	4	0	0	0	0	100
E92K	c.274G>A	SNV	Exón 4	0	0	1	0	0	100
E92X	c.274G>T	SNV	Exón 4	0	1	1	0	0	100
Q98X	c.292C>T	SNV	Exón 4	0	0	2	0	0	100
444delA	c.312delA	DIV	Exón 4	0	2	0	0	0	100
457TAT>G	c.325_327 delTAT insG	DIV	Exón 4	0	0	1	0	0	100

Genotipo (nombre común/ nombre de ADNc/coordenada)	Nombre de ADNc	Tipo de variante	Región del gen CFTR (hg19)	Llamadas positivas (variantes)			Ausencia de llamadas*	Llamadas incorrectas	Coincidencia positiva
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas			
D110H	c.328G>C	SNV	Exón 4	1	0	1	0	0	100
R117C	c.349C>T	SNV	Exón 4	4	0	0	0	0	100
R117H	c.350G>A	SNV	Exón 4	17	2	0	0	0	100
Y122X	c.366T>A	SNV	Exón 4	0	1	0	0	0	100
F143LfsX10	c.425delT	DIV	Exón 4	0	1	0	0	0	100
574delA	c.442delA	DIV	Exón 4	0	0	2	0	0	100
Q151K	c.451C>A	SNV	Exón 4	1	0	0	0	0	100
621+1G>T	c.489+1G>T	SNV	Intrón 4	7	5	0	0	0	100
621+3A>G	c.489+3A>G	SNV	Intrón 4	1	0	0	0	0	100
663delT	c.531delT	DIV	Exón 5	1	0	1	0	0	100
G178R	c.532G>A	SNV	Exón 5	1	1	0	0	0	100
711+1G>T	c.579+1G>T	SNV	Intrón 5	3	1	0	0	0	100
711+3A>G	c.579+3A>G	SNV	Intrón 5	0	0	1	0	0	100
711+5 G>A	c.579+5G>A	SNV	Intrón 5	0	0	1	0	0	100
712-1 G>T	c.580-1G>T	SNV	Exón 6	0	0	1	0	0	100
H199Y	c.595C>T	SNV	Exón 6	0	0	1	0	0	100
P205S	c.613C>T	SNV	Exón 6	1	0	1	0	0**	100
L206W	c.617T>G	SNV	Exón 6	8	1	0	0	0	100
A209S	c.625G>T	SNV	Exón 6	0	1	0	0	0	100
Q220X	c.658C>T	SNV	Exón 6	0	0	1	0	0	100
L227R	c.680T>G	SNV	Exón 6	0	0	1	0	0	100

Genotipo (nombre común/ nombre de ADNc/coordenada)	Nombre de ADNc	Tipo de variante	Región del gen CFTR (hg19)	Llamadas positivas (variantes)			Ausencia de llamadas*	Llamadas incorrectas	Coincidencia positiva
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas			
852del22	c.720_741 delAGGG AGAATG ATGATG AAGTAC	DIV	Exón 6	0	0	1	0	0	100
E279D	c.837A>T	SNV	Exón 7	1	0	0	0	0	100
R297Q	c.890G>A	SNV	Exón 8	2	0	0	0	0	100
1078delT	c.948delT	DIV	Exón 8	1	1	0	0	0	100
L320V	c.958T>G	SNV	Exón 8	1	0	0	0	0	100
G330X	c.988G>T	SNV	Exón 8	1	1	0	0	0	100
R334W	c.1000C>T	SNV	Exón 8	6	1	0	0	0	100
I336K	c.1007T>A	SNV	Exón 8	0	1	0	0	0	100
T338I	c.1013C>T	SNV	Exón 8	0	0	1	0	0	100
1154insTC	c.1022_10 23insTC	DIV	Exón 8	0	1	0	0	0	100
S341P	c.1021T>C	SNV	Exón 8	0	0	1	0	0	100
R347H	c.1040G>A	SNV	Exón 8	6	1	1	0	0	100
R347P	c.1040G>C	SNV	Exón 8	3	2	0	0	0	100
R352Q	c.1055G>A	SNV	Exón 8	5	0	0	0	0	100
Q359K/ T360K	c.[1075C>A ;1079C>A]	SNV	Exón 8	0	0	1	0	0	100
1213delT	c.1081delT	DIV	Exón 8	0	0	1	0	0	100
1248+1G>A	c.1116+1G>A	SNV	Intrón 8	0	0	1	0	0	100
1259insA	c.1127_11 28insA	DIV	Exón 9	0	0	2	0	0	100
W401X(c.1202G>A)	c.1202G>A	SNV	Exón 9	0	0	1	0	0	100
W401X(c.1203G>A)	c.1203G>A	SNV	Exón 9	0	0	1	0	0	100
1341+1G>A	c.1209+1G>A	SNV	Intrón 9	0	0	2	0	0	100

Genotipo (nombre común/ nombre de ADNc/coordenada)	Nombre de ADNc	Tipo de variante	Región del gen CFTR (hg19)	Llamadas positivas (variantes)			Ausencia de llamadas*	Llamadas incorrectas	Coincidencia positiva
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas			
Poli-TGPoli-T	N/A	Poli-TG Poli-T	Intrón 9	369	79	52	3	4 [#]	98,60
1461ins4	c.1329_1330ins AGAT	DIV	Exón 10	0	0	1	0	0	100
A455E	c.1364C>A	SNV	Exón 10	4	2	0	0	0	100
1525-1G>A	c.1393-1G>A	SNV	Exón 11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>A)	c.1397C>A	SNV	Exón 11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>G)	c.1397C>G	SNV	Exón 11	1	0	1	0	0	100
L467P	c.1400T>C	SNV	Exón 11	0	0	1	0	0	100
V470M	c.1408G>A	SNV	Exón 11	311	71	0	0	0	100
1548delG	c.1418delG	DIV	Exón 11	1	0	1	0	0	100
P477S	c.1429C>T	SNV	Exón 11	0	1	0	0	0	100
S485T	c.1454G>C	SNV	Exón 11	1	0	0	0	0	100
S489X	c.1466C>A	SNV	Exón 11	0	0	2	0	0	100
S492F	c.1475C>T	SNV	Exón 11	0	0	1	0	0	100
Q493X	c.1477C>T	SNV	Exón 11	4	2	0	0	0	100
I506V	c.1516A>G	SNV	Exón 11	7	0	0	0	0	100
I507del	c.1519_1521 delATC	DIV	Exón 11	4	2	0	0	0	100
F508del	c.1521_1523 delCTT	DIV	Exón 11	84	29	0	0	0	100
I507V	c.1519A>G	SNV	Exón 11	0	1	0	0	0	100
F508C	c.1523T>G	SNV	Exón 11	1	1	0	0	0	100
1677delTA	c.1545_1546 delTA	DIV	Exón 11	1	0	0	0	0	100

Genotipo (nombre común/ nombre de ADNc/coordenada)	Nombre de ADNc	Tipo de variante	Región del gen CFTR (hg19)	Llamadas positivas (variantes)			Ausencia de llamadas*	Llamadas incorrectas	Coincidencia positiva
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas			
V520F	c.1558G>T	SNV	Exón 11	2	0	0	0	0	100
Q525X	c.1573C>T	SNV	Exón 11	0	0	1	0	0	100
E527E	c.1581A>G	SNV	Exón 11	3	2	0	0	0	100
E528E	c.1584G>A	SNV	Exón 11	6	2	0	0	0	100
1717-8G>A	c.1585-8G>A	SNV	Intrón 11	0	0	1	0	0	100
1717-1G>A	c.1585-1G>A	SNV	Exón 12	4	1	0	0	0	100
G542X	c.1624G>T	SNV	Exón 12	12	3	0	0	0	100
S549R (c.1645A>C)	c.1645A>C	SNV	Exón 12	0	0	1	0	0	100
S549N	c.1646G>A	SNV	Exón 12	2	2	1	0	0	100
S549R (c.1647T>G)	c.1647T>G	SNV	Exón 12	3	1	0	0	0	100
G551D	c.1652G>A	SNV	Exón 12	8	3	0	0	0	100
Q552X	c.1654C>T	SNV	Exón 12	0	0	1	0	0	100
R553X	c.1657C>T	SNV	Exón 12	8	2	0	0	0	100
I556V	c.1666A>G	SNV	Exón 12	1	0	0	0	0	100
L558S	c.1673T>C	SNV	Exón 12	0	0	1	0	0	100
A559T	c.1675G>A	SNV	Exón 12	4	0	1	0	0	100
R560K	c.1679G>A	SNV	Exón 12	0	0	1	0	0	100
R560T	c.1679G>C	SNV	Exón 12	6	1	0	0	0	100
1811+1,6kb A>G	c.1679+1,6 kbA>G	SNV	Intrón 12	0	0	1	0	0	100
1812-1 G>A	c.1680-1G>A	SNV	Exón 13	0	2	0	0	0	100
A561T	c.1681G>A	SNV	Exón 13	1	0	0	0	0	100
V562I	c.1684G>A	SNV	Exón 13	1	0	0	0	0	100
Y569D	c.1705T>G	SNV	Exón 13	0	0	1	0	0	100

Genotipo (nombre común/ nombre de ADNc/coordenada)	Nombre de ADNc	Tipo de variante	Región del gen CFTR (hg19)	Llamadas positivas (variantes)			Ausencia de llamadas*	Llamadas incorrectas	Coincidencia positiva
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas			
P574H	c.1721C>A	SNV	Exón 13	0	1	0	0	0	100
G576A	c.1727G>C	SNV	Exón 13	4	1	0	0	0	100
D579G	c.1736A>G	SNV	Exón 13	0	0	1	0	0	100
E585X	c.1753G>T	SNV	Exón 13	0	0	1	0	0	100
1898+1G>A	c.1766+1G>A	SNV	Intrón 13	2	1	0	0	0	100
1898+3A>G	c.1766+3A>G	SNV	Intrón 13	0	0	1	0	0	100
H609R	c.1826A>G	SNV	Exón 14	0	1	0	0	0	100
D614G	c.1841A>G	SNV	Exón 14	0	0	2	0	0	100
R668C	c.2002C>T	SNV	Exón 14	5	2	0	0	0	100
R668H	c.2003G>A	SNV	Exón 14	1	0	0	0	0	100
2143delT	c.2012delT	DIV	Exón 14	2	1	0	0	0	100
K684TfsX4	c.2046_2047 delAA	DIV	Exón 14	0	0	1	0	0	100
2183AA>G	c.2051_2052 delAAinsG	DIV	Exón 14	3	1	0	0	0	100
2184delA	c.2052delA	DIV	Exón 14	1	1	0	0	0	100
2184insA	c.2052_2053 insA	DIV	Exón 14	3	0	1	0	0	100
S686Y	c.2057C>A	SNV	Exón 14	0	1	0	0	0	100
R709X	c.2125C>T	SNV	Exón 14	1	0	2	0	0	100
K710X	c.2128A>T	SNV	Exón 14	3	0	0	0	0	100
E725K	c.2173G>A	SNV	Exón 14	2	0	0	0	0	100
2307insA	c.2175_2176 insA	DIV	Exón 14	3	0	2	0	0	100
L732X	c.2195T>G	SNV	Exón 14	0	0	2	0	0	100
2347delG	c.2215delG	DIV	Exón 14	0	0	2	0	0	100
P750L	c.2249C>T	SNV	Exón 14	1	0	0	0	0	100

Genotipo (nombre común/ nombre de ADNc/coordenada)	Nombre de ADNc	Tipo de variante	Región del gen CFTR (hg19)	Llamadas positivas (variantes)			Ausencia de llamadas*	Llamadas incorrectas	Coincidencia positiva
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas			
V754M	c.2260G>A	SNV	Exón 14	2	1	0	0	0	100
R764X	c.2290C>T	SNV	Exón 14	1	0	2	0	0	100
2585delT	c.2453delT	DIV	Exón 14	0	0	2	0	0	100
E822X	c.2464G>T	SNV	Exón 14	0	0	2	0	0	100
2622+1G>A	c.2490+1G>T	SNV	Intrón 14	0	0	2	0	0	100
E831X	c.2491G>T	SNV	Exón 15	0	0	1	0	0	100
D836Y	c.2506G>T	SNV	Exón 15	0	1	0	0	0	100
W846X	c.2537G>A	SNV	Exón 15	0	1	0	0	0	100
R851X	c.2551C>T	SNV	Exón 15	0	0	1	0	0	100
T854T	c.2562T>G	SNV	Exón 15	212	44	0	0	0	100
2711delT	c.2583delT	DIV	Exón 15	0	0	1	0	0	100
V868V	c.2604A>G	SNV	Exón 15	2	0	0	0	0	100
c.2657+2_ 2657+3insA	c.2657+2_ 2657+3insA	DIV	Intrón 16	0	0	1	0	0	100
2789+5G>A	c.2657+5G>A	SNV	Intrón 16	9	1	0	0	0	100
Q890X	c.2668C>T	SNV	Exón 17	1	0	0	0	0	100
A923A	c.2769C>T	SNV	Exón 17	1	0	0	0	0	100
L927P	c.2780T>C	SNV	Exón 17	0	0	1	0	0	100
S945L	c.2834C>T	SNV	Exón 17	0	0	1	0	0	100
M952T	c.2855T>C	SNV	Exón 17	1	0	0	0	0	100
3007delG	c.2875delG	DIV	Exón 17	0	0	1	0	0	100
T966T	c.2898G>A	SNV	Exón 17	5	0	0	0	0	100
G970R	c.2908G>C	SNV	Exón 17	0	0	1	0	0	100
S977F	c.2930C>T	SNV	Exón 18	0	0	1	0	0	100
3120G>A	c.2988G>A	SNV	Exón 18	1	0	0	0	0	100
3120+1G>A	c.2988+1G>A	SNV	Intrón 18	7	1	0	0	0	100

Genotipo (nombre común/ nombre de ADNc/coordenada)	Nombre de ADNc	Tipo de variante	Región del gen CFTR (hg19)	Llamadas positivas (variantes)			Ausencia de llamadas*	Llamadas incorrectas	Coincidencia positiva
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas			
3121-1G>A	c.2989-1G>A	SNV	Exón 19	0	0	1	0	0	100
L997F	c.2991G>C	SNV	Exón 19	2	1	0	0	0	100
I1027T	c.3080T>C	SNV	Exón 19	1	2	0	0	0	100
3272-26A>G	c.3140-26A>G	SNV	Intrón 19	0	1	0	0	0	100
F1052V	c.3154T>G	SNV	Exón 20	0	1	0	0	0	100
L1065P	c.3194T>C	SNV	Exón 20	0	0	1	0	0	100
R1066C	c.3196C>T	SNV	Exón 20	6	0	0	0	0	100
R1066H	c.3197G>A	SNV	Exón 20	1	0	1	0	0	100
G1069R	c.3205G>A	SNV	Exón 20	0	1	0	0	0	100
R1070W	c.3208C>T	SNV	Exón 20	0	2	0	0	0	100
R1070Q	c.3209G>A	SNV	Exón 20	0	1	0	0	0	100
L1077P	c.3230T>C	SNV	Exón 20	0	0	1	0	0 ^Y	100
W1089X	c.3266G>A	SNV	Exón 20	4	0	0	0	0	100
Y1092X (C>A)	c.3276C>A	SNV	Exón 20	3	1	0	0	0	100
Y1092X (C>G)	c.3276C>G	SNV	Exón 20	0	0	1	0	0	100
T1095T	c.3285A>T	SNV	Exón 20	7	0	0	0	0	100
M1101K	c.3302T>A	SNV	Exón 20	2	2	0	0	0	100
E1104X	c.3310G>T	SNV	Exón 20	0	0	1	0	0	100
c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	SNV	Intrón 20	0	1	0	0	0	100
D1152H	c.3454G>C	SNV	Exón 21	10	1	0	0	0	100
V1153E	c.3458T>A	SNV	Exón 21	1	0	0	0	0	100
R1158X	c.3472C>T	SNV	Exón 22	7	1	0	0	0	100
R1162X	c.3484C>T	SNV	Exón 22	5	1	0	0	0	100
R1162L	c.3485G>T	SNV	Exón 22	0	2	0	0	0	100

Genotipo (nombre común/ nombre de ADNc/coordenada)	Nombre de ADNc	Tipo de variante	Región del gen CFTR (hg19)	Llamadas positivas (variantes)			Ausencia de llamadas*	Llamadas incorrectas	Coincidencia positiva
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas			
3659delC	c.3528delC	DIV	Exón 22	4	1	0	0	0	100
S1196X	c.3587C>G	SNV	Exón 22	1	0	0	0	0	100
W1204X (c.3611G>A)	c.3611G>A	SNV	Exón 22	0	0	1	0	0	100
W1204X (c.3612G>A)	c.3612G>A	SNV	Exón 22	0	0	1	0	0	100
3791delC	c.3659delC	DIV	Exón 22	2	0	0	0	0	100
I1234V	c.3700A>G	SNV	Exón 22	1	0	1	0	0	100
S1235R	c.3705T>G	SNV	Exón 22	9	1	0	0	0	100
3849+10 kbC>T	c.3717+ 12191C>T	SNV	Intrón 22	11	2	0	0	0	100
G1244E	c.3731G>A	SNV	Exón 23	0	0	1	0	0	100
3876delA	c.3744delA	DIV	Exón 23	6	1	0	0	0	100
S1251N	c.3752G>A	SNV	Exón 23	1	0	1	0	0	100
3905insT	c.3773_3774 insT	DIV	Exón 23	3	1	0	0	0	100
D1270N	c.3808G>A	SNV	Exón 23	0	2	0	0	0	100
W1282X	c.3846G>A	SNV	Exón 23	9	1	0	0	0	100
P1290P	c.3870A>G	SNV	Exón 23	10	3	0	0	0	100
4005+1G>A	c.3873+1G>A	SNV	Intrón 23	0	0	1	0	0	100
4016insT	c.3884_3885 insT	DIV	Exón 24	0	0	1	0	0	100
T1299T	c.3897A>G	SNV	Exón 24	3	0	0	0	0	100
N1303K	c.3909C>G	SNV	Exón 24	9	1	0	0	0	100
Q1313X	c.3937C>T	SNV	Exón 24	0	0	1	0	0	100
G1349D	c.4046G>A	SNV	Exón 25	0	1	0	0	0	100

Genotipo (nombre común/nombre de ADNc/coordenada)	Nombre de ADNc	Tipo de variante	Región del gen CFTR (hg19)	Llamadas positivas (variantes)			Ausencia de llamadas*	Llamadas incorrectas	Coincidencia positiva
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas			
4209TG TT>AA	c.4077_4080 delTGTT insAA	DIV	Exón 25	0	0	1	0	0	100
CFTR dele22,23	c.3964-78_ 4242+577del	Del	Intrón 24	1	0	1	0	0	100
4382delA	c.4251delA	DIV	Exón 27	0	0	1	0	0	100
Y1424Y	c.4272C>T	SNV	Exón 27	6	2	0	0	0	100
Q1463Q	c.4389G>A	SNV	Exón 27	150	32	0	0	0	100
Total de todas las variantes (coincidencia positiva)†					2072		3	4	99,66
Total de todas las cepas salvajes (coincidencia negativa)					2600928		1	2 [§]	> 99,99
Total de todas las cepas salvajes y variantes (coincidencia total)					2603000		4	6	> 99,99

DIV es la sigla en inglés de "variante de la deleción/inserción".

* No se volvieron a analizar las muestras.

^ El software no especifica el nombre de ADNc de esta coordenada genómica.

** El informe de Sanger indicó que la variante P205S era heterocigótica en el caso de la muestra clínica. En cambio, una revisión de los datos de rastreo de Sanger indicó que la variante era, en realidad, homocigótica y que se había notificado de forma incorrecta. MiSeqDx notificó que la variante era homocigótica.

Uno de los resultados que no concordaba provenía del estudio de reproducibilidad. El resultado de Poli-TG/Poli-T de la muestra concordaba con las 18 duplicaciones, pero no concordaba con la secuenciación bidireccional de Sanger.

¥ Se determinó que la muestra sintética heterocigótica original no se había preparado correctamente. Se detectó cuando se realizaron las pruebas posteriores a su preparación utilizando el mismo plásmido.

† La coincidencia positiva excluidas las llamadas de Poli-TG/Poli-T fue del 100 %.

§ En el caso de la variante CFTR dele22, 23, se notificó como heterocigótica una muestra heterocigótica sintética para el exón 8. Investigaciones posteriores revelaron que este resultado era probable a partir de un nivel de contaminación bajo. Asimismo, con una segunda muestra, los cebadores de Sanger no pudieron detectar completamente la variante Q1463Q debido a las inserciones y deleciones ascendentes y descendentes de la posición de la variante.

Tabla 23 Precisión de la variante Poli-TG/Poli-T para el ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística

Genotipo de Poli-TG/Poli-T	N.º de muestras clínicas	N.º de muestras de estirpe celular	N.º de muestras sintéticas	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas*	% Precisión
(TG)9(T)7/(TG)11(T)7	2	0	0	0	1	50,00
(TG)9(T)9/(TG)10(T)7	1	0	0	0	0	100

Genotipo de Poli-TG/Poli-T	N.º de muestras clínicas	N.º de muestras de estirpe celular	N.º de muestras sintéticas	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencias de llamadas*	% Precisión
(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)9	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	25	8	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	10	1	0	0	1	90,91
(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	7	6	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)7	13	0	0	0	1	92,31
(TG)11(T)5/(TG)11(T)7	6	0	0	1	0	83,33
(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	52	8	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9^	2	1	0	3	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
Total		448		4	3	98,44

* No se volvieron a analizar las muestras.

^ Uno de los resultados que no concordaba provenía del estudio de reproducibilidad. El resultado de Poli-TG/Poli-T de la muestra concordaba con las 18 duplicaciones, pero no concordaba con la secuenciación bidireccional de Sanger.

Reproducibilidad

La reproducibilidad del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística se determinó mediante un estudio a ciegas basado en tres centros de ensayo con dos operadores por centro. Cada uno de los operadores de cada centro comprobó dos paneles bien definidos de 46 muestras cada uno para un total de 276 resultados de muestras por operador. El panel contenía una mezcla de ADN genómico de estirpes celulares linfoblastoides con mutaciones conocidas en el gen *CFTR*, así como sangre desleucocitada con estirpes celulares linfoblastoides con mutaciones conocidas en el gen *CFTR*. Las muestras de sangre se proporcionaron para permitir la incorporación de los pasos de extracción utilizados en la preparación de ADN_g que sirve como la entrada principal del flujo de trabajo de ensayo.

El índice de aptitud de las muestras, definido como el número de muestras que superan los criterios de control de calidad en el primer intento, fue del 99,7 %. Todos los resultados se basan en la prueba inicial.

La coincidencia positiva en el nivel del genotipo de todas las variantes con la variante Poli-TG/Poli-T incluida fue del 99,22 %, mientras que, sin ella, fue del 99,60 %. La coincidencia negativa de todas las cepas salvajes fue del 99,70 % y la coincidencia total de todas las posiciones conocidas fue del 99,70 %. La coincidencia positiva de la variante Poli-TG/Poli-T fue del 97,83 %.

Tabla 24 Reproducibilidad del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística (excluyendo las variantes Poli-TG/Poli-T)

Muestra	Nombre de la HGVS (o ubicación sin HGVS)	Nombre de la variante	Resultados totales		Llamadas coincidentes			Total (todos los centros)		% de coincidencia
			Por centro	Todos los centros	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Ausencia de llamadas [€]	Llamadas incorrectas	
1	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
1	c.1646G>A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
1	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1581A>G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1680-1G>A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.3870A>G	P1290P	6	18	6	5	6	0	1	94,44
2	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1477C>T	Q493X	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100

Muestra	Nombre de la HGVS (o ubicación sin HGVS)	Nombre de la variante	Resultados totales		Llamadas coincidentes			Total (todos los centros)		% de coincidencia
			Por centro	Todos los centros	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Ausencia de llamadas [€]	Llamadas incorrectas	
3	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
4	c.1408G>A	V470M	6	18	5	6	6	1	0	94,44
4	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	5	6	6	1	0	94,44
4	c.2052delA	2184delA	6	18	5	6	6	1	0	94,44
5	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.224G>A	R75Q	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.2562T>G	T854T	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.3472C>T	R1158X	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.366T>A	Y122X	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.625G>T	A209S	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
6	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.2051_2052delAAinsG	2183AA>G	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.223C>T	R75X	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.3846G>A	W1282X	6	18	6	5	6	0	1*	94,44

Muestra	Nombre de la HGVS (o ubicación sin HGVS)	Nombre de la variante	Resultados totales		Llamadas coincidentes			Total (todos los centros)		% de coincidencia
			Por centro	Todos los centros	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Ausencia de llamadas [€]	Llamadas incorrectas	
9	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.3140-26A>G	3272-26A>G	6	18	6	5	6	0	1*	94,44
10	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
11, 39	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.2002C>T	R668C	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2988+1G>A	3120+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.489+1G>T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
13	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.178G>T	E60X	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100

Muestra	Nombre de la HGVS (o ubicación sin HGVS)	Nombre de la variante	Resultados totales		Llamadas coincidentes			Total (todos los centros)		% de coincidencia
			Por centro	Todos los centros	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Ausencia de llamadas [€]	Llamadas incorrectas	
15x	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.3080T>C	I1027T	6	18	6	6	6	0	0	100
17, 41	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
17, 41	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
17, 41	c.3528delC	3659delC	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.-4G>C	117120145	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.350G>A	R117H	12	36	12	12	12	0	0	100
19	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
19	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
19	c.579+1G>T	711+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
20, 43	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.254G>A	G85E	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.489+1G>T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1364C>A	A455E	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
22	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1679G>C	R560T	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100

Muestra	Nombre de la HGVS (o ubicación sin HGVS)	Nombre de la variante	Resultados totales		Llamadas coincidentes			Total (todos los centros)		% de coincidencia
			Por centro	Todos los centros	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Ausencia de llamadas [€]	Llamadas incorrectas	
22	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.3276C>A	Y1092X(C>A)	6	18	6	6	6	0	0	100
24, 45	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
24, 45	c.3909C>G	N1303K	12	36	12	12	12	0	0	100
24, 45	c.4046G>A	G1349D	12	36	12	12	12	0	0	100
25	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
25	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
27, 46	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1652G>A	G551D	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1657C>T	R553X	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
28	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.91C>T	R31C	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100

Muestra	Nombre de la HGVS (o ubicación sin HGVS)	Nombre de la variante	Resultados totales		Llamadas coincidentes			Total (todos los centros)		% de coincidencia
			Por centro	Todos los centros	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Ausencia de llamadas [€]	Llamadas incorrectas	
30	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.3485G>T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.1585-1G>A	1717-1G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.3484C>T	R1162X	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.1000C>T	R334W	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	6	18	6	6	6	0	0	100
35	c.1523T>G	F508C	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.254G>A	G85E	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.3454G>C	D1152H	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1007T>A	I336K	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.3705T>G	S1235R	6	18	6	6	6	0	0	100

Muestra	Nombre de la HGVS (o ubicación sin HGVS)	Nombre de la variante	Resultados totales		Llamadas coincidentes			Total (todos los centros)		% de coincidencia
			Por centro	Todos los centros	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Ausencia de llamadas [€]	Llamadas incorrectas	
38	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.1727G>C	G576A	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2002C>T	R668C	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2057C>A	S686Y	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
47, 85	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2657+5G>A	2789+5G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
48, 86	c.54-5940_ 273+10250del21kb	CFTRdele2,3	12	36	12	11	12	1	0	97,22
48, 86	c.1408G>A	V470M	12	36	12	11	12	1	0	97,22
48, 86	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	11	12	1	0	97,22
49, 87	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1766+1G>A	1898+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.220C>T	R74W	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.3808G>A	D1270N	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.2012delT	2143delT	12	36	12	12	12	0	0	100
52	c.3744delA	3876delA	6	18	6	6	6	0	0	100
53, 90	c.3773_3774insT	3905insT	12	36	12	12	12	0	0	100

Muestra	Nombre de la HGVS (o ubicación sin HGVS)	Nombre de la variante	Resultados totales		Llamadas coincidentes			Total (todos los centros)		% de coincidencia
			Por centro	Todos los centros	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Ausencia de llamadas [€]	Llamadas incorrectas	
54, 91	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
54, 91	c.262_263delTT	394delTT	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1519A>G	I507V	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.3080T>C	I1027T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
56	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.3154T>G	F1052V	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.3209G>A	R1070Q	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.2991G>C	L997F	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.3205G>A	G1069R	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.617T>G	L206W	6	18	6	6	6	0	0	100

Muestra	Nombre de la HGVS (o ubicación sin HGVS)	Nombre de la variante	Resultados totales		Llamadas coincidentes			Total (todos los centros)		% de coincidencia
			Por centro	Todos los centros	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Ausencia de llamadas [€]	Llamadas incorrectas	
61	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.2260G>A	V754M	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.988G>T	G330X	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1040G>A	R347H	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
65	c.948delT	1078delT	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.532G>A	G178R	6	18	6	6	6	0	0	100
67	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
67	c.1647T>G	S549R (c.1647T>G)	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1646G>A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
69	c.2506G>T	D836Y	6	18	6	6	6	0	0	100
69	c.2537G>A	W846X	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.3485G>T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100

Muestra	Nombre de la HGVS (o ubicación sin HGVS)	Nombre de la variante	Resultados totales		Llamadas coincidentes			Total (todos los centros)		% de coincidencia
			Por centro	Todos los centros	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Ausencia de llamadas [€]	Llamadas incorrectas	
71	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.274G>T	E92X	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
72	c.1022_1023insTC	1154insTC	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
73	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1826A>G	H609R	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	0	1	94,44
74	c.1429C>T	P477S	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
75	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
75	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
75	c.1721C>A	P574H	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
76	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.425delT	F143LfsX10	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1364C>A	A455E	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100

Muestra	Nombre de la HGVS (o ubicación sin HGVS)	Nombre de la variante	Resultados totales		Llamadas coincidentes			Total (todos los centros)		% de coincidencia
			Por centro	Todos los centros	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Ausencia de llamadas [€]	Llamadas incorrectas	
77	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1581A>G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1680-1G>A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.3870A>G	P1290P	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.220C>T	R74W	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.3808G>A	D1270N	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1657C>T	R553X	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100

Muestra	Nombre de la HGVS (o ubicación sin HGVS)	Nombre de la variante	Resultados totales		Llamadas coincidentes			Total (todos los centros)		% de coincidencia
			Por centro	Todos los centros	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Ausencia de llamadas [€]	Llamadas incorrectas	
83	c.-4G>C	11720145	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.350G>A	R117H	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
Total de todas las variantes (coincidencia positiva)** (incluyendo datos de Poli-TG/Poli-T de la Tabla 25)			2580	7740	2562	2553	2565	37	23	99,22
Total de todas las cepas salvajes (coincidencia negativa)			2871132	8613396	2865930	2855526	2865932	26006	2	99,70
Total de todas las cepas salvajes y variantes (coincidencia total)			2873712	8621136	2868492	2858079	2868497	26043	25	99,70

[€] No se volvieron a analizar las muestras.

[^] Un duplicado de cada una de las muestras 5 y 75 presentó un índice de llamada del 0 %. Investigaciones adicionales indicaron que es posible que las muestras no se hubiesen añadido a la placa de muestras antes de la preparación de bibliotecas.

*Tras su revisión, se comprueba que el operador ha podido alternar las muestras 9 y 10 antes de la preparación de bibliotecas.

** Excluidas las variantes de Poli-TG/Poli-T, la coincidencia positiva fue del 99,60 %.

Tabla 25 Reproducibilidad de Poli-TG/Poli-T para el ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística

Panel	Muestra	Genotipo	N.º de resultados		Llamadas coincidentes			Total de todos los centros		% de coincidencia
			Por centro	Todos los centros	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Ausencia de llamadas	Llamadas incorrectas	
A	1	(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	2	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	3	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	4	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
A	5	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	5	6	1	0	94,44 %

Panel	Muestra	Genotipo	N.º de resultados		Llamadas coincidentes			Total de todos los centros		% de coincidencia
			Por centro	Todos los centros	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Ausencia de llamadas	Llamadas incorrectas	
A	6	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	7	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	8	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	9	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	10	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	11, 39	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	12, 40	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	13	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	14	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	15	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	5	6	1	0	94,44 %
A	16	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	17, 41	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	18, 42	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	19	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	20, 43	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	21, 44	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	22	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	23	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	24, 45	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	25	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	26	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	27, 46	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	12	36	11	12	12	0	1	97,22 %
A	28	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	29	(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	4	4	4	0	77,78 %
A	30	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	31	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %

Panel	Muestra	Genotipo	N.º de resultados		Llamadas coincidentes			Total de todos los centros		% de coincidencia
			Por centro	Todos los centros	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Ausencia de llamadas	Llamadas incorrectas	
A	32	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	33	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
A	34	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	35	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	36	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	37	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	38	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	47, 85	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	48, 86	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	11	11	12	2	0	94,44 %
B	49, 87	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	50, 88	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	51, 89	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	52	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	53, 90	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	54, 91	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	55, 92	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	56	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	57	(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	58	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	59	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
B	60	(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	61	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	62	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
B	63	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	64	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
B	65	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %

Panel	Muestra	Genotipo	N.º de resultados		Llamadas coincidentes			Total de todos los centros		% de coincidencia
			Por centro	Todos los centros	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Ausencia de llamadas	Llamadas incorrectas	
B	66	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	67	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	68	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	69	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	70	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	71	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	72	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	5	6	5	2	0	88,89 %
B	73	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	74	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	75	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	5	6	1	0	94,44 %
B	76	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	77	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	78	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	79	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	80	(TG)11(T)7/(TG)11(T)9	6	18	0	0	0	0	18	0%
B	81	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	82	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	83	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	84	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
Total de variantes de Poli-TG/Poli-T (coincidencia positiva)			552	1656	537	540	543	17	19	97,83 %

* Las 18 muestras fueron coincidentes entre ellas, pero no coincidieron con la secuenciación bidireccional de Sanger.

Extracción de ADN

Se evaluaron tres métodos de extracción comercializados utilizados con frecuencia (extracción de bolas magnéticas, precipitación por alcohol y aislamiento de la columna de filtrado de silicio) con sangre total anticoagulada con EDTA K₂. Durante el estudio, se utilizó un total de 14 muestras de sangre. Dos muestras eran de cepa salvaje, mientras que las demás muestras contaban con genotipos únicos que representaban nueve variantes diferentes, entre las que se incluían variantes excepcionales y comunes. Para la variante Poli-TG/Poli-T, se incluyeron las muestras con (T)5-9 y (TG)10-12. Dos operadores diferentes comprobaron independientemente los tres métodos de extracción de ADN. Cada operador llevó a cabo tres experimentos por método de extracción. Cada operador realizó cada una de las extracciones en días diferentes. La concentración de ADN y el índice de A260/A280 de las muestras de ADNg extraídas se determinaron mediante espectrometría. El tamaño de muestras total para cada método de extracción en el estudio fue de 168 (14 muestras, 2 operadores/métodos de extracción, 3 experimentos/operador y 2 duplicados/muestra de ADNg extraída).

Método de extracción	Número de muestras analizadas	Índice de llamada	Exactitud	Índice de muestras del primer paso*
Precipitación por alcohol	168	>99,99 %	>99,99 %	100 %
Aislamiento de la columna de filtrado de silicio	168	>99,99 %	>99,99 %	100 %
Extracción de bolas magnéticas	168	>99,99 %	>99,99 %	100 %

* Porcentaje de muestras con un índice de llamada superior al 99 % en el primer experimento.

Entrada de ADN

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

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

Sustancias interferentes

Para evaluar el impacto de las sustancias interferentes en el sistema de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina, se calificó el rendimiento del ensayo en presencia y ausencia de posibles sustancias interferentes. En el estudio, se analizaron 16 muestras de sangre total con genotipos de fibrosis quística únicos. Se analizaron cuatro sustancias interferentes endógenas (bilirrubina, colesterol, hemoglobina y triglicéridos) añadiéndolas a las muestras de sangre antes de la extracción de ADN. En la tabla siguiente se muestran los límites de concentración de cada sustancia. Asimismo, para evaluar la interferencia resultante de la extracción de sangre (extracción breve), se añadió EDTA a las muestras de sangre y, para evaluar la interferencia resultante de la preparación de muestras, se añadió el tampón de lavado final del método de aislamiento de la columna de filtrado de silicio al ADN genómico purificado.

El ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística arrojó un índice de llamada del 100 % con todas las muestras analizadas, así como una reproducibilidad del 100 % en las llamadas de genotipo entre muestras en presencia y ausencia de sustancias interferentes. No se observaron interferencias relacionadas con sustancias interferentes exógenas o endógenas.

Para evaluar el impacto de la interferencia del cebador de índice del multiplexado, se llevó a cabo un estudio de la contaminación cruzada con dos muestras, cada una de ellas con genotipos homocigóticos únicos en cuatro posiciones genómicas diferentes, y dos cebadores de índice respectivos. No se observaron cambios en las llamadas de variantes con niveles de contaminación inferiores al 40 %. El genotipo de la muestra pasó a ser heterocigótico cuando los niveles de contaminación eran iguales o superiores al 40 %.

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

Equivalencia de rendimiento con el ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina

El ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística TruSight (TruSight CFCS) utiliza los mismos reactivos y el mismo flujo de trabajo de preparación de bibliotecas que el ensayo de fibrosis quística de MiSeqDx de Illumina (MiSeqDx CFCS). TruSight CFCS utiliza el kit de reactivos MiSeqDx v. 3, mientras que MiSeqDx CFCS usa reactivos de secuenciación incluidos con el ensayo. Para demostrar la equivalencia entre TruSight CFCS y MiSeqDx CFCS, se compararon los resultados de nueve experimentos de TruSight CFCS con un solo experimento de MiSeqDx CFCS como referencia. Los experimentos de TruSight CFCS se llevaron a cabo a un rendimiento de 96 muestras (el máximo rendimiento de muestras para TruSight CFCS) y los de MiSeqDx CFCS a un rendimiento de 48 muestras (el máximo rendimiento de muestras para MiSeqDx CFCS). Las fuentes de variabilidad incluidas en los experimentos de TruSight CFCS incluían tres eventos de preparación de bibliotecas (cada uno con un lote único de TruSight Cystic Fibrosis), tres operadores, tres instrumentos MiSeqDx y tres lotes del kit de reactivos MiSeqDx v. 3.

La llamadas de variantes de los experimentos de TruSight CFCS se compararon con las llamadas realizadas por el experimento de MiSeqDx CFCS. Se incluyeron 47 muestras únicas en cada experimento de TruSight CFCS, con dos o tres réplicas por muestra (95 muestras de ADN y un NTC por experimento). En el caso del experimento de MiSeqDx CFCS, se secuenciaron las mismas 47 muestras como Singleton (47 muestras de ADN + 1 NTC por experimento). El panel de muestras estaba compuesto de muestras de ADN de Coriell extraídas de estirpes celulares inmortalizadas e incluía muestras que representaban cada alelo de las 23 variantes de ACMG, variantes de delección/inserción (incluidas las inserciones y delecciones en regiones homopoliméricas e inserción con delección en la misma región), variantes homocigóticas, variantes heterocigóticas compuestas, una de las delecciones dirigidas de gran tamaño, variantes de Poli-TG/Poli-T, variantes de nucleótido único y una muestra sin variantes detectadas. El resumen de resultados por genotipo aparece en la [Tabla 26](#). La concordancia entre ensayos por tipo de variante aparece en la [Tabla 27](#). La coincidencia general total entre ensayos era de >99,99 %.

Tabla 26 Rendimiento de las llamadas de variantes del ensayo de variantes de CFCS de FQ TruSight en comparación con el ensayo de variantes de CFCS MiSeqDx

		Ensayo de secuenciación clínica de FQ MiSeqDx				
		Variante HOM	Variante HET	Estado natural	Ausencia de llamadas	Total
Ensayo de secuenciación clínica de FQ TruSight	Variante HOM	551	-	-	-	551
	Variante HET	-	2664	-	-	2664
	Estado natural	-	-	4 426 182	-	4 426 182
	Ausencia de llamadas	-	-	58	-	58
	Total	551	2664	4 426 420	-	4 429 455

Tabla 27 Rendimiento por tipo de variante del ensayo de secuenciación clínica de FQ TruSight en comparación con el ensayo de secuenciación clínica de FQ MiSeqDx

Tipo de variante	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	Acuerdo con el ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística MiSeqDx
SNV	2684	0	0	100,00 % (2684/2684)
DEL	18	0	0	100,00 % (18/18)
DIV	513	0	0	100,00 % (513/513)
Poli-TG/Poli-T	847	1	3	99,88 % (847/851)
Ninguno (estado natural)	4 426 182	0	58	100,00 % (4 426 182/4 426 240)
Total	4 430 244	1	61	>99,99 % (4 430 244/4 430 306)

Se ha observado una sola llamada que no concordaba entre TruSight CFCS y MiSeqDx CFCS. La llamada incorrecta en concreto era una variante Poli-TG/Poli-T. La [Tabla 28 en la página 92](#) presenta un resumen de la concordancia Poli-TG/Poli-T.

Tabla 28 Rendimiento de las llamadas de variantes Poli-TG/Poli-T del ensayo de secuenciación clínica de FQ TruSight en comparación con el ensayo de secuenciación clínica de FQ MiSeqDx

		Tabla del ensayo de secuenciación clínica de FQ MiSeqDx												
		(TG)10 (T)7/ (TG)10 (T)7	(TG)10 (T)7/ (TG)10 (T)9	(TG)10 (T)7/ (TG)12 (T)5	(TG)10 (T)7/ (TG)12 (T)7	(TG)10 (T)9/ (TG)10 (T)9	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	(TG)11 (T)7/ (TG)10 (T)7	(TG)11 (T)7/ (TG)10 (T)9	(TG)11 (T)7/ (TG)11 (T)7	(TG)11 (T)7/ (TG)12 (T)7	(TG)12 (T)5/ (TG)12 (T)5	Ausencia de llamadas	Total
Ensayo de secuenciación clínica de FQ TruSight	(TG)10(T)7/ (TG)10(T)7	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
	(TG)10(T)7/ (TG)10(T)9	-	189	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	189
	(TG)10(T)7/ (TG)12(T)5	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18
	(TG)10(T)7/ (TG)12(T)7	-	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-	-	18
	(TG)10(T)9/ (TG)10(T)9	-	-	-	-	72	-	-	-	-	-	-	-	72
	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-	17
	(TG)11(T)7/ (TG)10(T)7	-	-	-	-	-	-	126	-	-	-	-	-	126
	(TG)11(T)7/ (TG)10(T)9	-	-	-	-	-	-	-	249	-	-	-	-	249
	(TG)11(T)7/ (TG)11(T)7	-	-	-	-	-	-	-	-	72	-	-	-	72
	(TG)11(T)7/ (TG)12(T)7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36	-	-	36
	(TG)12(T)5/ (TG)12(T)5	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
	Ausencia de llamadas	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3
	Total		50	189	18	18	72	18	126	252	72	36	-	-

Referencias

- 1 Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, et al. (2004) Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genetics in Medicine* 6(5): 387–391.
- 2 Committee on Genetics. (Abril de 2011) The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee Opinion. Update on Carrier Screening for Cystic Fibrosis 486: 1–4.
- 3 Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, Farrell PM. (2002) Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations—Correlation With Incidence Data and Application to Screening. *Human Mutation* 19:575–606.
- 4 Moskowitz SM, Chmiel JF, Steman DL, Cheng E, Gibson RL, et al. (2008) Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genetics in Medicine* 10(12):851–868.
- 5 Moskowitz SM, Chmiel JF, Steman DL, Cheng E, Cutting GR. CFTR-related disorders. Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington; 2008. Disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250. [En línea]. Actualizado el 19 de febrero de 2008.
- 6 Katkin JP. (2012) Cystic fibrosis: Clinical manifestations and diagnosis. Disponible en www.uptodate.com. [En línea] 7 de diciembre de 2012.
- 7 Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, et al. 2008 Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 153(2): S4–S14.
- 8 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2010.
- 9 Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). Disponible en www.genet.sickkids.on.ca/app. [En línea] Agosto de 2013.
- 10 Rohlf EM, Zhou Z, Heim R, Nagan N, Rosenblum L, et al. (2011) Cystic Fibrosis Carrier Testing in an Ethnically Diverse US Population. *Clinical Chemistry*; 57(6): 841–848.
- 11 Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). Disponible en www.cftr2.org. [En línea]. Agosto de 2013.
- 12 The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) Project. Disponible en www.nacconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf. [En línea]. Presentado por Gary Cutting en representación del proyecto CFTR2 en la 25.ª conferencia anual de fibrosis quística norteamericana (25th Annual North American Cystic Fibrosis Conference [NACFC]) patrocinada por la fundación para la fibrosis quística Cystic Fibrosis Foundation. 4 de noviembre de 2011. Anaheim, CA.
- 13 Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, et al. (2013) Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nature Genetics* 45 (10): 1160–1167.
- 14 Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. (Marzo/abril de 2001) Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. *Genetics in Medicine* 3(2): 149–154.
- 15 Castellani C, Cuppens H, Macek H Jr, Cassiman JJ, Kerem E, et al. (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cystic Fibrosis* 7:179–196.
- 16 Pratt VM, Caggana M, Bridges C, Buller AM, DiAntonio L, et al. (Mayo de 2009) Development of Genomic Reference Materials for Cystic Fibrosis Genetic Testing. *Journal of Molecular Diagnostics* 11(3): 186–193.
- 17 Amos J, Feldman GL, Grody WW, Monaghan K, Palomaki GE, et al. (Edición de 2008 revisada en marzo de 2011) American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Clinical Genetic Laboratories.
- 18 Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine*. *Genetics in Medicine* 15(9): 733–747.

Patentes y marcas comerciales

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

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

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

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

© 2021 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

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

AMPure, Beckman y Beckman Coulter son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de Beckman Coulter, Inc.

Información de contacto



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



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

Patrocinador australiano

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

Etiquetado de productos

Consulte la clave de símbolos de su kit en support.illumina.com para acceder a una referencia completa de símbolos que podrían aparecer en etiquetas y envases de productos.