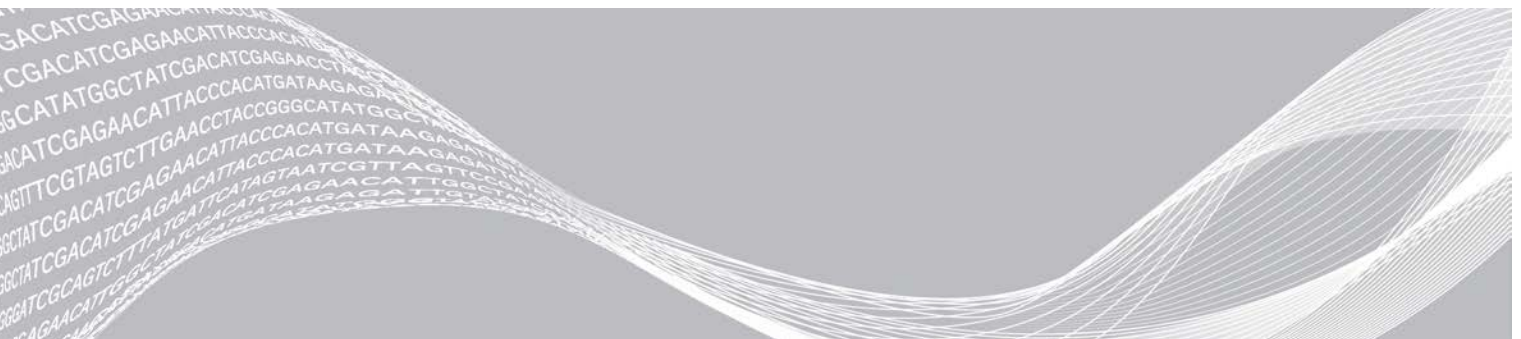


Módulo de análisis Germline Variant (Variante germinal) de Local Run Manager

Guía de flujo de trabajo para NextSeq 550Dx

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

Descripción general	3
Introducir la información sobre el experimento	4
Métodos de análisis	6
Visualización de los datos del experimento y la muestra	7
Informe del análisis	8
Archivos de resultados de análisis	9
Historial de revisiones	17
Asistencia técnica	18



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.

Descripción general

El módulo Germline Variant (Variante germinal) de Local Run Manager se utiliza con el ensayo del kit de amplicones personalizados TruSeq Dx de Illumina y el NextSeq 550Dx. Cuando se utiliza con el módulo Germline Variant (Variante germinal), este ensayo está diseñado para la preparación de bibliotecas que van a servir para la secuenciación de ADN de muestras de sangre total periférica.

Este módulo de análisis evalúa regiones cortas de ADN amplificado, o amplicones, para detectar variantes. La secuenciación de amplicones enfocada permite una alta cobertura de regiones particulares. Consulte el prospecto del *Kit de amplicones personalizados TruSeq Dx* (n.º de documento 1000000029772).

El módulo de análisis Germline Variant (Variante germinal) precisa consumibles de secuenciación de 300 ciclos. Para obtener más información, consulte el prospecto del *kit de reactivos de rendimiento elevado NextSeq 550Dx v2* o del *kit de reactivos de rendimiento elevado NextSeq 550Dx v2.5*.

Acerca de esta guía

Esta guía facilita las instrucciones necesarias para configurar los parámetros de experimentos de secuenciación y de análisis del módulo de análisis Germline Variant (Variante germinal). Para obtener información sobre el panel de Local Run Manager y la configuración del sistema, consulte la *Guía de referencia del instrumento NextSeq 550Dx* (n.º de documento 1000000009513).

Visualización de Local Run Manager

La interfaz de Local Run Manager se visualiza con el software operativo (NOS) de NextSeq 550Dx o mediante un explorador web. El explorador web compatible es Chromium.



NOTA

Si utiliza un explorador no compatible, descargue uno compatible cuando se le indique mediante el mensaje "Confirm Unsupported Browser" (Confirmar explorador no compatible). Seleccione "**here**" (aquí) para descargar la versión compatible de Chromium.

Vista del monitor del instrumento

- 1 Para ver la interfaz de Local Run Manager en el monitor del instrumento, seleccione una de las siguientes opciones:
 - ▶ En la pantalla de inicio de NOS, seleccione **Local Run Manager**. Haga clic en X en la esquina superior derecha para volver a NOS, una vez finalizado.
 - ▶ Seleccione el icono Minimizar NOS, abra el explorador web Chromium que se encuentra en el instrumento e introduzca **http://localhost** en la barra de direcciones. Solo los administradores pueden minimizar NOS.

Vista desde un ordenador conectado a una red

- 1 Abra el explorador web Chromium en un ordenador que disponga de acceso a la misma red en la que se encuentra el instrumento y conéctese por medio del nombre o de la dirección IP del instrumento. Por ejemplo, **http://myinstrument**.

Introducir la información sobre el experimento

Configuración de parámetros

- 1 Inicie sesión en Local Run Manager.
- 2 Seleccione **Create Run** (Crear experimento) y elija **Germline Variant** (Variante Germline).
- 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.
- 4 **(Opcional)** Escriba una descripción que ayude a identificar el experimento.
Utilice caracteres alfanuméricos, espacios o guiones tanto normales como bajos.
- 5 Seleccione el número de muestras y la configuración del índice de la lista desplegable.
Tenga en cuenta la siguiente información a la hora de hacer la selección.
 - ▶ La lista desplegable contiene números de muestras con un juego de índices. Por ejemplo, 24-Set 1 indica 24 muestras que analizar, con índices del juego 1 de índices.
 - ▶ Los números de juego de índices hacen referencia a los distintos juegos de índices i5. Tanto el juego 1 como el juego 2 proporcionan diversidad de índices. Se ofrecen dos juegos de índices para ayudar a prevenir la eliminación de un único juego.
 - ▶ Escoja el número de muestras que más se acerque a la cantidad de muestras que vaya a analizar. Si la cantidad exacta de muestras no aparece en el desplegable, elija el número más próximo, pero siempre inferior al número de muestras que se van a analizar. Por ejemplo, si va a analizar 18 muestras, seleccione 16.
 - ▶ Las combinaciones de índices y pocillos de muestras sugeridas que cumplen los requisitos de diversidad de índices están resaltadas en color verde. Si selecciona otras combinaciones de pocillos e índices, al guardar el experimento recibirá una notificación si no se cumplen los requisitos de diversidad de índices.

Importación de archivos de manifiesto para el experimento

- 1 Asegúrese de que los manifiestos que necesita importar están a su disposición a través de una ubicación accesible de la red o de un dispositivo USB.
- 2 Haga clic en **Import Manifest** (Importar manifiesto).
- 3 Vaya al archivo de manifiesto y elija los manifiestos que quiere añadir.



NOTA

Para que los archivos de manifiesto estén disponibles para cualquier experimento en el que se utilice el módulo de análisis Germline Variant (Variante germinal), añada los manifiestos por medio de la función Module Settings (Ajustes del módulo). Para acceder a esta función es necesario obtener permisos de administrador. Para obtener más información, consulte la *Guía de referencia del instrumento NextSeq 550Dx* (n.º de documento 1000000009513).

Definir las muestras para el experimento


Defina las muestras que se van a utilizar en el experimento por medio de una de las siguientes opciones.

- ▶ **Introducción manual de las muestras:** utilice la tabla en blanco que aparece en la pantalla Create Run (Crear experimento).

- ▶ **Importar las 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.


Una vez que haya rellenado la tabla de muestras, puede exportar la información de las muestras a un archivo externo. Use el archivo a modo de referencia cuando prepare bibliotecas o impórtelo para otro experimento.

Introducir las muestras de forma manual

- 1 Introduzca un único ID de muestra en el campo Sample ID (ID de muestra).
Puede utilizar caracteres alfanuméricos y guiones tanto normales como bajos.
- 2 **(Opcional)** Para las muestras de control tanto negativo como positivo, haga clic en el botón derecho del ratón y seleccione el tipo de control.
- 3 **(Opcional)** Introduzca la descripción de la muestra en el campo Sample Description (Descripción de la muestra).
Puede utilizar caracteres alfanuméricos y guiones tanto normales como bajos.
Las descripciones de la muestra se asocian a los nombres de la muestra. Las descripciones de la muestra se sobrescribirán si se utiliza de nuevo el mismo nombre de muestra en un experimento posterior.
- 4 Seleccione un adaptador del Index 1 (Índice 1) del menú desplegable que aparece en el Índice 1 (i7).
Si utiliza los pocillos de muestra sugeridos, el software rellena automáticamente los adaptadores de índices i7 e i5 que cumplen los requisitos de índice de diversidad. Si la cantidad exacta de muestras que está analizando no aparece en el desplegable, asegúrese de seleccionar los adaptadores de índices para los pocillos de más. Si tiene que seleccionar índices para más pocillos, o si no utiliza las combinaciones de adaptadores de índice recomendadas, antes de elegir los índices consulte el apartado *Llamada de bases y diversidad de índices en la página 16*.
- 5 Seleccione un adaptador del Index 2 (Índice 2) del menú desplegable que aparece en el Índice 2 (i5).
- 6 Elija un archivo de manifiesto de la lista que aparece en el desplegable del campo Manifest (Manifiesto).
- 7 Seleccione la opción correspondiente para visualizar, imprimir o guardar la disposición de la placa para utilizarla como referencia a la hora de preparar bibliotecas:
 - ▶ Haga clic en el icono  **Print** (Imprimir) para ver la disposición de la placa. Seleccione **Print** (Imprimir) para imprimir la disposición de la placa.
 - ▶ Seleccione **Export** (Exportar) para exportar la información sobre las muestras a un archivo externo. Asegúrese de que el manifiesto y la información sobre la muestra son correctos. Si la información no es la adecuada, los resultados se pueden ver afectados.
- 8 Seleccione **Save Run** (Guardar Experimento).

Importar las muestras

- 1 Seleccione **Import Samples** (Importar muestras) y busque la ubicación del archivo que contiene la información sobre la muestra. Se pueden importar dos tipos de archivo.
 - ▶ Para crear una nueva disposición de placa, haga clic en **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. Introduzca en cada columna la información relativa a las muestras del experimento. Elimine la información que aparece como ejemplo en las celdas que no vaya a utilizar y guarde el archivo.
 - ▶ Emplee uno de los archivos de información de las muestras que se hayan exportado del módulo Germline Variant (Variante germinal) con la función Export (Exportación).

- 2 Seleccione 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 **(Opcional)** Seleccione **Export** (Exportar) para exportar la información sobre las muestras a un archivo externo.
Asegúrese de que el manifiesto y la información sobre la muestra son correctos. Si la información no es la adecuada, los resultados se pueden ver afectados.
- 5 Seleccione **Save Run** (Guardar Experimento).

Editar un experimento

Para obtener instrucciones sobre cómo editar la información del experimento antes de comenzar la secuenciación, consulte la *Guía de referencia del instrumento NextSeq 550Dx (n.º de documento 1000000009513)*.

Métodos de análisis

El módulo de análisis Germline Variant (Variante germinal) lleva a cabo los siguientes pasos correspondientes al análisis y después genera los archivos de resultados que ubicará en la carpeta Alignment (Alineación).

- ▶ Lecturas de índice de demultiplexado
- ▶ Generación de archivos FASTQ
- ▶ Alineación de acuerdo con una referencia
- ▶ Identificación de variantes

Demultiplexado

El demultiplexado compara cada secuencia de lectura de índice con la secuencia de índice que se ha fijado para el experimento. En este paso, no se considera ningún valor de calidad.

Las lecturas de índice se pueden identificar por medio de los siguientes pasos:

- ▶ Las muestras están numeradas comenzando por el número uno de acuerdo con el lugar que ocupan en el experimento.
- ▶ La muestra número cero se reserva para los grupos que no se han asignado al experimento.
- ▶ Los grupos se asignan a una muestra siempre que la secuencia de índice coincida de forma exacta o cuando exista solamente una discrepancia por lectura de índice.

Generación de archivos FASTQ

Tras el demultiplexado, el software genera archivos de análisis intermedios en el formato FASTQ, que es un formato de texto empleado para representar secuencias. Los archivos FASTQ incluyen las lecturas de cada muestra con sus puntuaciones de calidad correspondientes. Los grupos que no han podido pasar los filtros quedan excluidos.

Cada archivo FASTQ contiene las lecturas de una sola muestra, cuyo nombre está incluido en el nombre del archivo FASTQ. Los archivos FASTQ son la entrada principal para la alineación. Por cada muestra se generan ocho archivos FASTQ: cuatro de la Lectura 1 y otros cuatro de la Lectura 2.

Alineación

A lo largo del proceso de alineación, el algoritmo Smith-Waterman alinea las agrupaciones de cada muestra con las secuencias del amplicón que determina el archivo de manifiesto.

El algoritmo Smith-Waterman lleva a cabo alineaciones de secuencias semiglobales para establecer las regiones similares que hay en dos secuencias. En lugar de comparar la secuencia total, el algoritmo Smith-Waterman compara los segmentos de todas las longitudes posibles.

En el caso de la lectura "paired-end", se evalúa teniendo en cuenta su alineación respecto a las secuencias de sonda significativas de dicha lectura.

- ▶ La Lectura 1 se evalúa de acuerdo con el complemento inverso de los oligonucleótidos descendentes de locus específico (DLSO).
- ▶ La Lectura 2 se evalúa teniendo en cuenta oligonucleótidos ascendentes de locus específico (ULSO).
- ▶ Si el comienzo de una lectura observa una coincidencia con la secuencia de sonda con menos de tres diferencias (discrepancias o cambios producidos por las inserciones y deleciones), la lectura completa se alineará con el amplicón objetivo de esa secuencia.
- ▶ Las inserciones y deleciones dentro del DLSO y del ULSO no se observan debido a los procesos químicos del ensayo.

Las alineaciones se filtran teniendo en cuenta los resultados de alineación, que se basan en los índices de discrepancia que se encuentran en la región estudiada o en el amplicón completo, dependiendo de la longitud de este último. Las alineaciones filtradas se copian en los archivos de alineación como no alineadas y por tanto no se utilizan para la llamada de variantes.

Llamadas de variantes

Desarrollado por Illumina, Pisces Variant Caller (Llamador de Variantes Pisces) identifica las variantes que están presentes en una muestra de ADN.


El llamador de variantes Pisces identifica las SNV, las MNV y pequeñas inserciones y deleciones en tres pasos:


- ▶ Tiene en cuenta cada posición en el genoma de referencia de forma independiente.
- ▶ Cuenta las bases en la posición que se ha determinado para las lecturas alineadas que se solapan en la posición.
- ▶ Calcula una puntuación de variante que mide la calidad de la llamada a través del modelo Poisson. Se excluyen todas las variantes cuya puntuación de calidad sea menor al Q20.

Si la variante pasa todos los filtros, se marca como PASS (Apta) en el VCF.

Si desea obtener más información, consulte la página github.com/Illumina/Pisces/wiki.

Visualización de los datos del experimento y la muestra

- 1 Una vez en el panel principal de Local Run Manager, haga clic en el nombre del experimento.
- 2 En la ficha Run Overview (Resumen del experimento), revise los criterios de medición del experimento de secuenciación.
- 3 **(Opcional)** Haga clic en el icono **Copy to Clipboard**  (Copiar en el portapapeles) para copiar la ruta de la carpeta en la que se encuentran los resultados del experimento.

- 4 Haga clic en la ficha Sequencing Information (Información sobre la secuenciación) para verificar los parámetros del experimento y la información sobre los consumibles.
- 5 Haga clic en la ficha Samples and Results (Muestras y resultados) para ver dónde se encuentran ubicados los informes del análisis.
 - ▶ En caso de repetir el análisis, abra el menú desplegable Select Analysis (Seleccionar análisis) para seleccionar un análisis y escoja el que proceda.
- 6 Haga clic en el icono **Copy to Clipboard**  (Copiar en el portapapeles) para copiar la ruta de la carpeta Analysis (Análisis).

Para obtener más información sobre las fichas Run Overview (Resumen del experimento) y Sequencing Information (Información sobre la secuenciación), así como sobre cómo volver a poner un análisis en cola, consulte la *Guía de referencia del instrumento NextSeq 550Dx (con n.º de referencia 1000000009513)*.

Informe del análisis

Los resultados del análisis se encuentran resumidos en la ficha Samples and Results (Muestras y resultados) y en la carpeta Alignment (Alineación) en forma de informe global. Existe la posibilidad de encontrar un informe individual de cada muestra en archivos con formato PDF.

Información de la ficha Samples and Results (Muestras y resultados)

- 1 Haga clic en una de las muestras del listado para ver el informe de muestras.

Tabla 1 Información sobre el experimento y la muestra

Encabezado de columna	Descripción
Run Status (Estado del experimento)	Determina si el experimento de secuenciación es apto o no.
Total Yield (Rendimiento total) (GB)	Número de bases que se han llamado en el experimento de secuenciación. Muestra el umbral determinado para considerar el experimento como apto y su estado como apto o no apto.
% ≥ Q30 (Porcentaje ≥ Q30)	Porcentaje de lecturas realizadas en un experimento de secuenciación que han logrado una puntuación de calidad igual o mayor que 30 (Q30). Muestra el umbral determinado para considerar el experimento como apto y su estado como apto o no apto.
Sample ID (ID de la muestra)	Es el ID de la muestra que se introdujo al crear el experimento.
Total PF Reads (Total de lecturas PF)	Cantidad total de lecturas que han pasado el filtro.
Read 1% ≥ Q30 (Porcentaje de lectura 1 ≥ Q30)	Porcentaje de lecturas llevadas a cabo en la lectura 1 que han logrado una puntuación de calidad para la muestra igual o mayor que 30 (Q30).
Read 2% ≥ Q30 (Porcentaje de lectura 2 ≥ Q30)	Porcentaje de lecturas llevadas a cabo en la lectura 2 que han logrado una puntuación de calidad para la muestra igual o mayor que 30 (Q30).
Autosome call rate (Índice de llamada de autosomas)	Número de posiciones genómicas en los autosomas (desde el cromosoma 1 hasta el 22) que cumplen un umbral de valor de confianza predeterminado dividido entre la cantidad total de posiciones genómicas autosómicas interrogadas. El índice de llamada se describe por muestra y se incluye en el informe en forma de porcentaje que se calcula como uno menos (número de posiciones autosómicas con llamadas incompletas dividido entre el número total de posiciones autosómicas secuenciadas).

Tabla 2 Datos sobre el informe de la muestra

Encabezado de columna	Descripción
Sample (Muestra)	Es el ID de la muestra que se introdujo al crear el experimento.
Report Date (Fecha del informe)	Fecha en la que se generó el informe.
Sample Information (Información sobre la muestra)	ID de muestra que se proporcionó en el momento de la creación del experimento, la cantidad total de lecturas de la muestra que han pasado el filtro, el porcentaje de lecturas que han obtenido una puntuación de calidad igual o mayor que 30 (Q30) y el índice de llamada autosómico.
Amplicon Summary (Resumen del amplicón)	Presenta la cantidad total de regiones de amplicón que se han secuenciado y la longitud total de los pares de bases en las regiones objetivo incluidas en la muestra y el archivo de manifiesto. El archivo de manifiesto indica el genoma de referencia y las regiones de referencia objetivo que se han utilizado en el paso de alineación.
Read Level Statistics (Estadísticas de lectura)	Muestra la cantidad y el porcentaje de lecturas llevadas a cabo en la muestra que cubren todas las posiciones en la referencia incluidos en la Lectura 1 y la Lectura 2.
Variants Summary (Resumen de variantes)	Indica la cantidad total de SNV, inserciones y deleciones que se han detectado en la muestra y que han superado los valores propuestos con el objetivo de definir si la calidad de los resultados se encuentra dentro del margen admisible.
Coverage Summary (Resumen de la cobertura)	Muestra la cantidad total de bases alineadas dividida por el tamaño de la región objetivo y el porcentaje de las regiones del amplicón con valores de cobertura mayores que los del umbral de baja cobertura (0,2 * cobertura media del amplicón) de la muestra correspondiente.
Coverage Plots (Diagramas de cobertura)	El diagrama de la cobertura por cada región del amplicón muestra la cobertura de todas las regiones del amplicón de la muestra. Las regiones cuyos valores de cobertura son menores que el valor del umbral de cobertura se destacan en rojo. La media de la totalidad de los valores se indica con una línea naranja.
Software Versions (Versiones del software)	Muestra las versiones del software en el momento que se ha secuenciado la muestra. Contiene la versión del software operativo de NextSeq 550Dx (NOS), del software Local Run Manager, del software RTA y del módulo Germline Variant (Variante germinal).

Archivos de resultados de análisis

Se generan los siguientes archivos de resultado de análisis para el módulo de análisis Germline Variant (Variante germinal), que proporcionan los resultados de los análisis de alineación y de llamada de variantes. Los archivos de resultados de análisis están ubicados en la carpeta Alignment (Alineación).

Nombre de archivo	Descripción
Demultiplexado (*.txt)	Son archivos intermedios que contienen un resumen de los resultados del demultiplexado.
FASTQ (*.fastq.gz)	Son archivos intermedios que contienen las puntuaciones de calidad de las llamadas a las bases. Los archivos FASTQ son la entrada principal para el paso de alineación.
Archivos de alineación en formato BAM (*.bam)	Contienen las lecturas alineadas de una muestra específica.
Archivos de llamada de variantes en formato VCF de genoma (*.genome.vcf.gz)	Contiene el genotipo para cada posición, ya sea porque se ha llamado como variante o como referencia.

Nombre de archivo	Descripción
Archivos de llamadas de variantes en formato VCF (*.vcf.gz)	Engloba todas las llamadas de variantes por toda la región objetivo.
AmpliconCoverage_M1.tsv	Incluye la información sobre la cobertura por cada amplicón de cada muestra para cada manifiesto que se ha proporcionado. M# hace referencia al número de manifiesto.

Formato de archivo del demultiplexado

El proceso de demultiplexado lee la secuencia de índice asociada a cada grupo para determinar en qué muestra se ha originado. La correspondencia entre los grupos y los números de muestra se registra en un archivo de demultiplexado (*.demux) por cada placa de la celda de flujo.

El formato de nomenclatura del archivo de demultiplexado es **s_1_X.demux**, en el que X representa el número de placa.

Los archivos de demultiplexado comienzan con un encabezado:

- ▶ Versión (número entero de cuatro bytes), que actualmente es 1.
- ▶ Recuento de grupos (número entero de 4 bytes).

El resto del archivo contiene los números de muestra de cada grupo de la placa.

Cuando finaliza en proceso de demultiplexado, el software genera un archivo de demultiplexado que se denominará **ResumendemultiplexadoF1L1.txt**.

- ▶ En el nombre del archivo, **F1** corresponde al número de la celda de flujo.
- ▶ En el nombre del archivo, **L1** corresponde al número del carril.
- ▶ El demultiplexado da como resultado una tabla con una fila por cada placa y una columna por cada muestra, incluida la muestra cero.
- ▶ Las secuencias más habituales en las lecturas de índice.

Formato de archivo FASTQ

El formato FASTQ es un formato de archivo de texto que engloba las llamadas a las bases y los valores de calidad por cada lectura. Cada registro incluye cuatro líneas:

- ▶ Identificador
- ▶ Secuencia
- ▶ Signo de suma (+)
- ▶ Una puntuación de calidad según la escala Phred en formato encriptado ASCII + 33

El identificador tiene el siguiente formato:

**@Instrumento:IDExperimento:IDCeldaFlujo:Carril:Placa:X:Y
NúmeroLectura:IndicadorFiltro:0:NúmeroMuestra**

Ejemplo:

```
@SIM:1:FCX:1:15:6329:1045 1:N:0:2
TCGCACTCAACGCCCTGCATATGACAAGACAGAATC
+
<>;##=><9=AAAAAAAAAA9#:<#<;<<<?????#=#
```

Formato de archivo BAM

Un archivo BAM (*.bam) es la versión binaria comprimida de un archivo SAM que se utiliza para representar secuencias alineadas de hasta 128 Mb. Puede encontrar la descripción detallada de los formatos SAM y BAM en samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf.

Los archivos BAM emplean el formato de nomenclatura de archivos **SampleName_S#.bam**, donde # es el número de la muestra determinado por el orden en que aparecen las muestras en el experimento.

Los archivos BAM contienen una sección de encabezado y una sección de alineaciones:

- ▶ **Encabezado:** contiene información sobre todo el archivo como, por ejemplo, el nombre de la muestra, su longitud y el método de alineación. Las alineaciones de la sección de alineaciones están asociadas a la información específica de la sección del encabezado.
- ▶ **Alineaciones:** contiene el nombre, la secuencia y la calidad de la lectura e información sobre la alineación, así como etiquetas personalizadas. El nombre de la lectura incluye el cromosoma, la coordenada de inicio, la calidad de la alineación y la secuencia del descriptor de la coincidencia.

La sección de alineaciones contiene la siguiente información por cada lectura o par de lectura:

- ▶ **AS:** calidad de alineación de "paired-end".
- ▶ **RG:** grupo de lecturas, que indica la cantidad de lecturas para cada muestra determinada.
- ▶ **BC:** etiqueta de código de barras, que indica el ID de la muestra demultiplexada que está vinculado a la lectura.
- ▶ **SM:** calidad de alineación "single-end".
- ▶ **XC:** secuencia del descriptor de la coincidencia.
- ▶ **XN:** etiqueta con el nombre del amplición, que registra el ID del amplición vinculado a la lectura.

Los archivos de índice BAM (*.bam.bai) facilitan un índice del archivo BAM correspondiente.

Formato de archivo VCF

El formato de llamada de variantes (VCF, del inglés "Variant Call Format") es un formato de archivo que ha desarrollado la comunidad científica que trabaja con la genómica. Contiene información sobre las variantes que se encuentran en posiciones específicas de un genoma de referencia. Los archivos VCF terminan con el sufijo ".vcf".

El encabezado del archivo VCF incluye la versión del formato de archivo VCF y la versión del llamador de variantes, además de mostrar un listado de las anotaciones que se utilizan en el resto del archivo. El encabezado del VCF también contiene el archivo del genoma de referencia y un archivo BAM. La última línea del encabezado incluye los encabezados de columna para las líneas de datos. Cada una de las líneas de datos del archivo VCF contiene información sobre una variante.

Encabezados de archivo VCF

Encabezado	Descripción
CHROM	El cromosoma del genoma de referencia. Los cromosomas aparecen en el mismo orden que el archivo FASTQ de referencia.
POS	La posición de base única de la variante en el cromosoma de referencia. En el caso de los SNP, esta posición es la base de referencia con la variante. En el caso de las inserciones o las deleciones, esta posición es la base de referencia justo antes de la variante.

Encabezado	Descripción
ID	Corresponde al número rs para la variante obtenida a partir del dbSNP.txt, si procede. Si existen varios números rs en esta posición, la lista queda delimitada por punto y coma. Si no existen entradas de dbSNP en esta posición, se utiliza un marcador de valor ausente ('.').
REF	El genotipo de referencia. Por ejemplo, una delección de una sola T se representa como TT de referencia y T alternativa. Una variante de nucleótido único de A a T se representa como A de referencia y T alternativa.
ALT	Los alelos que difieren de la lectura de referencia. Por ejemplo, una inserción de una única T se representa como A de referencia y AT alternativa. Una variante de nucleótido único de A a T se representa como A de referencia y T alternativa.
QUAL	Puntuación de calidad según la escala Phred asignada por el llamador de variantes. Las puntuaciones más altas indican una mayor seguridad en la variante y una menor probabilidad de errores. Para una puntuación de calidad de Q, la probabilidad estimada de un error es $10^{-(Q/10)}$. Por ejemplo, el conjunto de llamadas de Q30 tiene un índice de error del 0,1 %. Muchos llamadores de variantes asignan puntuaciones de calidad según sus modelos estadísticos, que son altas en relación con el índice de error observado.

Anotaciones de archivos VCF

Encabezado	Descripción
FILTER (FILTRO)	<p>Si se superan todos los filtros, aparece PASS (APTO) en la columna de filtrado.</p> <ul style="list-style-type: none"> • LowDP (DP baja): se aplica a los lugares con una profundidad de cobertura por debajo de 150x. Esta medida es equivalente a 300 lecturas "paired-end" solapadas cuando nos referimos a las posiciones del amplicón que están cubiertas por las lecturas que se realizan tanto hacia adelante como hacia atrás. • Q20: la puntuación de calidad es inferior a 20. • MultiAllelicSite: la variante no se ajusta al modelo diploide. • R5x9: la cantidad de repeticiones adyacentes (de una longitud entre uno y cinco pares de bases) en las llamadas de variantes es igual o superior a 9. • SB: el corte de la cadena es mayor que el umbral que se ha determinado.
INFO (INFORMACIÓN)	<p>Las entradas que se pueden encontrar en la columna INFO (Información) incluyen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • AC: recuento de alelos en genotipos de cada alelo ALT, en el mismo orden en que se enumeran. • AF: frecuencia de alelos de cada alelo ALT, en el mismo orden en que se enumeran. • AN: número total de alelos en genotipos llamados. • CD: señal indicativa de que el SNP se encuentra dentro de la región de codificación de, al menos, una entrada de RefGene. • DP: profundidad (número de llamadas de bases alineadas en una posición y que se utilizan en las llamadas de variantes). • Exon: lista de valores separados por comas que incluye las regiones de exones leídos en RefGene. • FC: consecuencia funcional. • GI: lista de valores separados por comas que incluye los ID de genes leídos en RefGene. • QD: seguridad de la variante y calidad por profundidad. • TI: lista de valores separados por comas que incluye los ID de transcripción leídos en RefGene.
FORMAT (FORMATO)	<p>La columna de formato muestra en una lista los campos separados por dos puntos. Por ejemplo, GT:GQ. La lista de campos que se muestra depende del llamador de variantes que se haya utilizado. Los campos de los que se dispone incluyen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • AD: entrada con formato X,Y, donde X es el número de llamadas de referencia e Y es el número de llamadas alternativas. • DP: profundidad de lectura aproximada; se filtran las lecturas con MQ = 255 o con emparejamientos erróneos. • GQ: calidad del genotipo. • GT: genotipo. 0 corresponde a la base de referencia, 1 corresponde a la primera entrada en la columna ALT y, así, sucesivamente. La barra inclinada (/) indica que no hay información de hebras retrasadas disponible. • NC: proporción de las bases a las que no se ha llamado o una calidad de llamada de bases inferior al umbral mínimo. • NL: nivel de ruido. Estimación del ruido en la llamada de bases en la posición correspondiente. • SB: cortes de la cadena en la posición correspondiente. Los valores negativos más grandes indican un sesgo menor, mientras que las posiciones cercanas a cero indican uno mayor. • VF: frecuencia de variante. Se trata del porcentaje de lecturas del alelo alternativo.
SAMPLE (MUESTRA)	<p>La columna SAMPLE (MUESTRA) incluye los valores especificados en la columna FORMAT (FORMATO).</p>

Archivos VCF de genoma

Los archivos VCF de genoma (gVCF) son archivos VCF en versión 4.1 que obedecen a una serie de convenciones para representar todas las posiciones que hay en un genoma en un formato bastante compacto. Los archivos gVCF (*.genome.vcf.gz) albergan todas las posiciones dentro de cada región estudiada en un solo archivo por cada muestra.

Los archivos gVCF no muestran las llamadas en las posiciones que no han pasado los filtros. Etiqueta de genotipo (GT) de ./.. Indica que no se ha hecho llamada.

Para obtener más información, consulte sites.google.com/site/gvcftools/home/about-gvcf.

Archivo de cobertura de amplicones

Se genera un archivo de cobertura de amplicones por cada archivo de manifiesto. "M#" en el nombre del archivo hace referencia al número de manifiesto.

Todos los archivos contienen una fila de encabezado que incluye los ID de muestra asociados con el manifiesto. El archivo contiene la siguiente información.

- ▶ El ID objetivo tal y como aparece en el manifiesto.
- ▶ La profundidad de cobertura de las lecturas que han pasado el filtro.

Archivos de resultados complementarios

Los siguientes archivos de resultados proporcionan información complementaria. También pueden incluir resúmenes de errores de análisis y resultados de experimentos. Aunque estos archivos no resultan necesarios para evaluar los resultados de los análisis, se pueden utilizar para la solución de posibles problemas. Todos los archivos están ubicados en la carpeta Alignment (Alineación) a menos que se indique lo contrario.

Nombre de archivo	Descripción
AnalysisLog.txt	Registro de procesamiento que describe todos los pasos que se han seguido durante el análisis de la carpeta del experimento actual. Este archivo no contiene mensajes de error. Está ubicado en la carpeta Alignment (Alineación).
AnalysisError.txt	Registro de procesamiento que enumera todos los errores que se han producido durante el análisis. Este archivo aparecerá vacío si no se produjo ningún error. Está ubicado en la carpeta Alignment (Alineación).
DemultiplexSummaryF1L1#.txt	Informa de los resultados del demultiplexado en una tabla con una fila por cada placa y una columna por cada muestra. El símbolo # indica el carril de la celda de flujo: uno, dos, tres o cuatro. Está ubicado en la carpeta Alignment (Alineación).
AmpliconRunStatistics.xml	Contiene las estadísticas de resumen específicas del experimento. Está ubicado en la carpeta Alignment (Alineación).

Carpeta de análisis

La carpeta de análisis contiene los archivos que genera el software Local Run Manager.


La relación entre la carpeta de resultados y la carpeta de análisis se resume de la siguiente manera:


- ▶ Durante la secuenciación, el análisis en tiempo real (RTA) llena la carpeta de resultados con los archivos que se han generado en los procesos de análisis de imágenes, de llamada a las bases y de puntuación de calidad.
- ▶ El RTA hace una copia en tiempo real de los archivos en la carpeta de análisis. Una vez el RTA ha vinculado la puntuación de calidad a cada base de cada ciclo, el software rellena el archivo RTAComplete.txt que se encuentra en ambas carpetas.
- ▶ Una vez existe el archivo RTAComplete.txt, el análisis puede comenzar a ejecutarse.
- ▶ Durante el análisis, Local Run Manager genera los archivos con los resultados y los envía a la carpeta de análisis al tiempo que hace copias de ellos en la carpeta de resultados.


Carpetas Alignment (Alineación)

Cada vez que se vuelve a poner en cola un experimento, Local Run Manager genera una carpeta Alignment (Alineación) con el nombre **Alignment_N**, donde N es un número secuencial.

Estructura de carpetas

 **Alignment** (Alineación): contiene los archivos *.bam, *.vcf y FASTQ, así como los archivos específicos del módulo de análisis.


 **Date and Time Stamp** (Marca de fecha y hora): marca la fecha y la hora del análisis en el formato AAAAMMDD_HHMMSS.



-  AnalysisError.txt
-  AnalysisLog.txt
-  aggregate.report.html
-  aggregate.report.pdf
-  aggregate.summary.csv
-  AmpliconCoverage_M#.tsv
-  AmpliconRunStatistics.xml
-  Sample1.genome.vcf.gz
-  Sample1.coverage.csv
-  Sample1.report.pdf
-  Sample1.summary.csv
-  Sample1.vcf.gz
-  Sample1.bam

 **FASTQ**

 **Sample1**

-  Sample1_L001_R1_001_fastq.gz

 **Stats** (Estadísticas)

-  DemuxSummaryF1L1.txt
-  FastqSummaryF1L1.txt

 **Data** (Datos)


 **Intensities** (Intensidades)


 **BaseCalls** (Llamadas de bases)

 **L001**: contiene archivos *.bcl.

 **L001**: contiene archivos *.locs.


 **RTA Logs** (Registros RTA): incluye los archivos de registro del software de análisis RTA.

 **InterOp**: contiene los archivos binarios que se utilizan para informar sobre los criterios de medición de los experimentos de secuenciación.

 **Logs** (Registros): son los archivos de registro que señalan los pasos que se han seguido durante la secuenciación.

 RTAComplete.txt

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

Llamada de bases y diversidad de índices

Al secuenciar muestras en el instrumento NextSeq 550Dx, la llamada de bases determina una base (A, C, G o T) por cada grupo de una placa concreta, o área de adquisición de imágenes en la celda de flujo, durante un ciclo específico. El instrumento NextSeq 550Dx utiliza la secuenciación de dos canales, que precisa solo dos imágenes para codificar los datos de cuatro bases de ADN: una del canal rojo y otra del canal verde.

El proceso de llamada de bases de las lecturas de índice difiere de la llamada de bases durante otras lecturas.

Las lecturas de índice deben comenzar, al menos, con una base diferente de G en cualquiera de los dos primeros ciclos. Si una lectura de índice comienza con dos llamadas de bases G, no se genera ninguna intensidad de señal. La señal debe estar presente en cualquiera de los dos primeros ciclos para garantizar el rendimiento del demultiplexado.

Al seleccionar índices durante la creación del experimento, aparecerá una advertencia de diversidad baja si los índices no cumplen los requisitos de diversidad. Para evitar que aparezca la advertencia de diversidad baja, seleccione secuencias de índice que proporcionen señal en ambos canales en cada ciclo.

- ▶ Canal rojo: A o C
- ▶ Canal verde: A o T

Este proceso de llamada de bases garantiza la precisión al analizar muestras de bajo plexado. Si desea más información sobre las secuencias de sus índices, consulte el prospecto del *Kit de amplicones personalizados TruSeq Dx* (n.º de documento 1000000029772).

Durante la creación del experimento en Local Run Manager, deberá elegir el número de muestras que analizar. El software rellena automáticamente las combinaciones de índices sugeridas que cumplen los requisitos de diversidad de índices. Aunque no es necesario utilizar las combinaciones de índices sugeridas, se recomienda hacerlo.

Historial de revisiones

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de documento 100000030329 v04	Agosto de 2021	Se ha modificado la dirección del representante autorizado en la UE.
N.º de documento 100000030329 v03	Abril de 2020	Se ha modificado la dirección del representante autorizado en la UE. Se ha modificado la dirección del patrocinador australiano.
N.º de documento 100000030329 v02	Enero de 2019	Adición de información sobre los kits de reactivos v2.5.
N.º de documento 100000030329 v01	Agosto de 2018	Se han actualizado las marcas normativas.
N.º de documento 100000030329 v00	Noviembre de 2017	Publicación inicial.

Asistencia técnica

Si necesita asistencia técnica, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

Sitio web: www.illumina.com
 Correo electrónico: techsupport@illumina.com

Números del servicio de asistencia al cliente de Illumina

Región	Teléfono gratuito	Regional
Norteamérica	+1.800.809.4566	
Alemania	+49 8001014940	+49 8938035677
Australia	+1.800.775.688	
Austria	+43 800006249	+43 19286540
Bélgica	+32 80077160	+32 34002973
China	400.066.5835	
Dinamarca	+45 80820183	+45 89871156
España	+34 911899417	+34 800300143
Finlandia	+358 800918363	+358 974790110
Francia	+33 805102193	+33 170770446
Hong Kong	800960230	
Irlanda	+353 1800936608	+353 016950506
Italia	+39 800985513	+39 236003759
Japón	0800.111.5011	
Noruega	+47 800 16836	+47 21939693
Nueva Zelanda	0800.451.650	
Países Bajos	+31 8000222493	+31 207132960
Reino Unido	+44 8000126019	+44 2073057197
Singapur	+1.800.579.2745	
Suecia	+46 850619671	+46 200883979
Suiza	+41 565800000	+41 800200442
Taiwán	00806651752	
Otros países	+44.1799.534000	

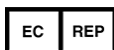
Hojas de datos de seguridad (SDS): Disponibles en el sitio web de Illumina, support.illumina.com/sds.html.

Documentación del producto: Disponible para su descarga en formato PDF en el sitio web de Illumina. Vaya a support.illumina.com, seleccione un producto y, a continuación, seleccione **Documentation & Literature** (Documentación y bibliografía).



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

CE



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

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

© 2021 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

illumina®