



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

DISPOSICIÓN N°

9442

BUENOS AIRES, '11 NOV. 2015

VISTO el expediente N° 1-47-3110-3178/14-4 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma BIOSYSTEMS S.A. solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos del Producto para diagnóstico de uso "in vitro" denominado 1) GENETIC SEQUENCING INSTRUMENT - MiSeqDx™/ INSTRUMENTO DE SECUENCIACIÓN QUE MIDE LAS SEÑALES DE FLUORESCENCIA DE NUCLEOTIDOS MARCADOS MEDIANTE EL USO DE CELDAS DE FLUJO Y REACTIVOS ESPECÍFICOS (MiSeqDx™ Universal Kit 1.0); 2) MiSeqDx™ UNIVERSAL KIT 1.0/ PARA EL PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE ADN GENÓMICO HUMANO OBTENIDAS A PARTIR DE SANGRE TOTAL PERIFÉRICA Y EN LA POSTERIOR SECUENCIACIÓN SELECTIVA DE LAS BIBLIOTECAS DE MUESTRAS RESULTANTES; 3) MiSeqDx™ CYSTIC FIBROSIS CLINICAL SEQUENCING ASSAY/ DISEÑADO PARA LA SECUENCIACIÓN DE LAS REGIONES CODIFICANTES Y LAS REGIONES DE UNIÓN DE INTRONES Y EXONES DEL GEN REGULADOR DE LA CONDUCTANCIA TRANSMEMBRANA DE LA FIBROSIS QUISTICA (CFTR) A PARTIR DE ADN GENÓMICO AISLADO A PARTIR DE SANGRE HUMANA TOTAL; 4) MiSeqDx™ CYSTIC FIBROSIS 139- VARIANT ASSAY/ ENSAYO CUALITATIVO DISEÑADO PARA DETECTAR EN FORMA SIMULTANEA 139

✓
A

LV



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

DISPOSICIÓN N° 9442

MUTACIONES Y VARIANTES DE INTERÉS CLÍNICO EN EL GEN REGULADOR DE LA CONDUCTANCIA TRANSMEMBRANA DE LA FIBROSIS QUISTICA (CFTR).

Que a fojas 1066 a 1070 consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que la Dirección Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establece la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por el Decreto N° 1490/92, por el Decreto N° 1886/14 y el Decreto N° 1368/15.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

D I S P O N E:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la venta a laboratorios de análisis clínicos del producto de diagnóstico para uso in Vitro denominado 1) GENETIC SEQUENCING INSTRUMENT – MiSeqDx™/ INSTRUMENTO DE SECUENCIACIÓN QUE MIDE LAS SEÑALES DE FLUORESCENCIA DE NUCLEOTIDOS MARCADOS MEDIANTE EL USO DE CELDAS DE FLUJO Y REACTIVOS ESPECÍFICOS (MiSeqDx™ Universal Kit 1.0); 2) MiSeqDx™ UNIVERSAL KIT 1.0/ PARA EL PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

DISPOSICIÓN N° 9442

ADN GENÓMICO HUMANO OBTENIDAS A PARTIR DE SANGRE TOTAL PERIFÉRICA Y EN LA POSTERIOR SECUENCIACIÓN SELECTIVA DE LAS BIBLIOTECAS DE MUESTRAS RESULTANTES; 3) MiSeqDx™ CYSTIC FIBROSIS CLINICAL SEQUENCING ASSAY/ DISEÑADO PARA LA SECUENCIACIÓN DE LAS REGIONES CODIFICANTES Y LAS REGIONES DE UNIÓN DE INTRONES Y EXONES DEL GEN REGULADOR DE LA CONDUCTANCIA TRANSMEMBRANA DE LA FIBROSIS QUISTICA (CFTR) A PARTIR DE ADN GENÓMICO AISLADO A PARTIR DE SANGRE HUMANA TOTAL; 4) MiSeqDx™ CYSTIC FIBROSIS 139- VARIANT ASSAY/ ENSAYO CUALITATIVO DISEÑADO PARA DETECTAR EN FORMA SIMULTANEA 139 MUTACIONES Y VARIANTES DE INTERÉS CLÍNICO EN EL GEN REGULADOR DE LA CONDUCTANCIA TRANSMEMBRANA DE LA FIBROSIS QUISTICA (CFTR), el que será elaborado por ILLUMINA. 5200 Illumina Way. San Diego, CA 92122. (USA) e importado terminado por la firma BIOSYSTEMS S.A. en envases que se detallan en el Anexo, con una vida útil de 1) CINCO (5) años, desde la fecha de elaboración conservado entre -10 y 40 °C; 2), 3) y 4) TRECE (13) meses, desde la fecha de elaboración conservado: caja 1 y 2 entre -25 y -15 °C, caja 3 y 4 entre 2 y 8 °C y caja 5 entre 15 – 30 °C y que la composición se detalla a fojas 10 a 12, 534 a 536 y 547 a 549.

ARTICULO 2º.- Acéptense los proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones a fojas 109, 121, 133, 144 a 501, 559 a 915, 917 a 948, 950 a 981, 983 a 1014, 1016 a 1031, 1033 a 1048 y 1050 a 1065. Desglosándose fojas 133, 144 a 198, 303 a 368, 559 a 625, 760 a 811, 917 a 948 y 1016 a 1031 debiendo constar en

✓

LV



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

DISPOSICIÓN Nº 9442

los mismos que la fecha de vencimiento es la declarada por el elaborador impreso en los rótulos de cada partida.

ARTÍCULO 3º.- Extiéndase el Certificado correspondiente.

ARTICULO 4º.- LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MEDICA se reserva el derecho de reexaminar los métodos de control, estabilidad y elaboración cuando las circunstancias así lo determinen.

ARTÍCULO 5º.- Regístrese, gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a sus efectos, por el Departamento de Mesa de Entradas notifíquese al interesado y hágasele entrega de la copia autenticada de la presente Disposición, junto con la copia de los proyectos de rótulos, manual de instrucciones y el certificado correspondiente. Cumplido, archívese.-

EXPEDIENTE Nº 1-47-3110-3178/14-4

DISPOSICIÓN Nº: 9442

Fd

[Handwritten mark]

[Handwritten mark]

DR. LEONARDO VERNA
SUBADMINISTRADOR NACIONAL
DECRETO N° 1368/2015
A.N.M.A.T.



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

9442

ANEXO

Expediente Nº 1-47-3110-3178/14-4

PRODUCTO:

- 1) GENETIC SEQUENCING INSTRUMENT – MiSeqDx™: No aplica.
- 2) MiSeqDx™ UNIVERSAL KIT 1.0: 96 determinaciones, conteniendo:

- Caja 1:

Reactivos de preamplificación de la caja 1A:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Tampón de hibridación	1 tubo	4,32ml
Mezcla de extensión-ligadura	1 tubo	4,8ml
Cebadores de índice A(A501)-H(A508)	1 tubo por cebador	192µl
Cebadores de índice I (A701)-I2 (A712)	1 tubo por cebador	128µl
Poliomerasa de PCR	1 tubo	56µl
Mezcla maestra de PCR	1 tubo	2,8ml

Reactivos de posamplificación de la caja 1B:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Diluyente de normalización de bibliotecas	1 tubo	4,6ml
Tampón de dilución De biblioteca	1 tubo	4,5ml
Control interno PhiX	1 tubo	10µl

- Caja 2:

Reactivos de posamplificación de la caja 2:

Componente	Cantidad
Cartucho de reactivo de MiSeqDx	2 cartuchos

Handwritten signature

LV



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

- Caja 3:

Reactivos de preamplificación de la caja 3A:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Tampón de lavado restrictivo	1 botella	24ml
Tampón de lavado universal	1 tubo	4,8ml

Reactivos de posamplificación de la caja 3B:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Bolas de limpieza de PCR	1 tubo	5ml
Lavado de normalización de bibliotecas	2 tubos	4,8ml
Bolas de biblioteca	1 tubo	1,2ml
Celda de flujo MiSeqDx	2 contenedores	1 celda de flujo

- Caja 4:

Reactivos de posamplificación de la caja 4:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Solución SBS de MiSeqDx(PR2)	2 botellas	353,1ml

- Caja 5:

Reactivos de preamplificación de la caja 5:

Componente	Cantidad
Placa del filtro	2 placas

Reactivos de posamplificación de la caja 5:

[Handwritten signature]
L
LV



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Tampón de elución	1 tubo	4,8ml
Tampón de almacenamiento de biblioteca	1 tubo	3,5ml

3) MiSeqDx™ CYSTIC FIBROSIS CLINICAL SEQUENCING ASSAY: 48 determinaciones, conteniendo:

- Caja 1:

Reactivos de preamplificación de la caja 1A:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Grupo de Oligonucleótidos del Ensayo de Secuenciación clínica De fibrosis quística.	1 tubo	600µl
Tampón de hibridación	1 tubo	4,32ml
Mezcla de extensión-ligadura	1 tubo	4,8ml
Cebadores de índice C(A503), D(A504) y E(A505)	1 tubo por cebador	192µl
Cebadores de índice 1(A701), 2(A702) y 10(A710)	1 tubo por cebador	128µl
Polimerasa de PCR	1 tubo	56µl
Mezcla maestra de PCR	1 tubo	2,8ml

Reactivos de posamplificación de la caja 1B:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Diluyente de normalización de bibliotecas	1 tubo	4,6ml
Tampón de dilución De biblioteca	1 tubo	4,5ml

[Handwritten signature]
LV



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

Control interno PhiX	1 tubo	10µl
----------------------	--------	------

- Caja 2:

Reactivos de posamplificación de la caja 2:

Componente	Cantidad
Cartucho de reactivo de MiSeqDx: Ensayo de secuenciación clínica de FQ	6 cartuchos

- Caja 3:

Reactivos de preamplificación de la caja 3A:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Tampón de lavado restrictivo	1 botella	24ml
Tampón de lavado universal	1 tubo	4,8ml

Reactivos de posamplificación de la caja 3B:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Bolas de limpieza de PCR	1 tubo	5ml
Lavado de normalización de bibliotecas	2 tubos	4,8ml
Bolas de biblioteca	1 tubo	1,2ml
Celda de flujo de MiSeqDx: Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística	6 contenedores	1 celda de flujo

- Caja 4:

Reactivos de posamplificación de la caja 4:

Handwritten signature/initials



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Solución SBS de MiSeqDx(PR2): Ensayo de Secuenciación clínica de la fibrosis quística	6botellas	353,1ml

- Caja 5:

Reactivos de preamplificación de la caja 5:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Placa del filtro	6placas	N/A

Reactivos de posamplificación de la caja 5:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Tampón de elución	1tubo	4,8ml
Tampón de almacenamiento de biblioteca	1tubo	3,5ml

4) MiSeqDxTM CYSTIC FIBROSIS 139- VARIANT ASSAY: 96 determinaciones o 960 determinaciones, conteniendo:

- Caja 1:

Reactivos de preamplificación de la caja 1A:

Componente	Cantidad		Volumen de llenado
	96 determinaciones	96 determinaciones	

[Handwritten signature]
LV



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

Grupo de Oligonucleótidos de 139 variantes de fibrosis quística	10 tubos	1 tubo	600µl
Tampón de hibridación	10 tubos	1 tubo	4,32ml
Mezcla de extensión-ligadura	10 tubos	1 tubo	4,8ml
Cebadores de índice A(A501)-H(A508)	10 tubos por cebador	1 tubo por cebador	192µl
Cebadores de índice 1 (A701)-12 (A712)	10 tubos por cebador	1 tubo por cebador	128µl
Polimerasa de PCR	10 tubos	1 tubo	56µl
Mezcla maestra de PCR	10 tubos	1 tubo	2,8ml

Reactivos de posamplificación de la caja 1B:

Componente	Cantidad		Volumen de llenado
	960 determinaciones	96 determinaciones	
Diluyente de normalización de bibliotecas	10 tubos	1 tubo	4,6ml
Tampón de dilución de biblioteca	10 tubos	1 tubo	4,5ml
Control interno PhiX	1 tubo	1 tubo	10µl

• Caja 2:

Reactivos de posamplificación de la caja 2:

Componente	Cantidad	
	960 determinaciones	96 determinaciones
Cartucho de reactivo De MiSeqDx del ensayo de 139 variantes de FQ	20 cartuchos	2 cartuchos

• Caja 3:

Reactivos de preamplificación de la caja 3A:

A

F LV.



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

Componente	Cantidad		Volumen de llenado
	960 determinaciones	96 determinaciones	
Tampón de lavado restrictivo	10 botellas	1 botella	24ml
Tampón de lavado universal	10 tubos	1 tubo	4,8ml

Reactivos de posamplificación de la caja 3B:

Componente	Cantidad		Volumen de llenado
	960 determinaciones	96 determinaciones	
Bolas de limpieza de PCR	10 tubos	1 tubo	5ml
Lavado de normalización de bibliotecas	20 tubos	2 tubos	4,8ml
Bolas de biblioteca	10 tubos	1 tubo	1,2ml
Celda de flujo de MiSeqDx del ensayo de 139 variantes de FQ	20 contenedores	2 contenedores	1 celda de flujo

• Caja 4:

Reactivos de posamplificación de la caja 4:

Componente	Cantidad		Volumen de llenado
	960 determinaciones	96 determinaciones	
Solución SBS de MiSeqDx (PR2) del ensayo de 139 variantes de FQ	20 botellas	2 botellas	353,1ml

• Caja 5:

Reactivos de preamplificación de la caja 5:

Componente	Cantidad	
	960 determinaciones	96 determinaciones

[Handwritten marks: a checkmark and the letters 'LV']



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

Placa del filtro	20placas	2placas
------------------	----------	---------

Reactivos de posamplificación de la caja 5:

Componente	Cantidad		Volumen de llenado
	960 determinaciones	96 determinaciones	
Tampón de elución	10 tubos	1 tubo	4,8ml
Tampón de almacenamiento de biblioteca	10 tubos	1 tubo	3,5ml

DISPOSICIÓN Nº: **9442**

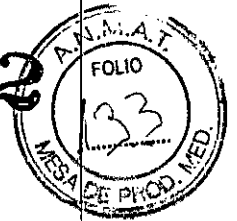
fd

[Handwritten marks]

DR. LEONARDO MERNA
SUBADMINISTRADOR NACIONAL
DECRETO N° 1368/2015
A.N.M.A.T.

9442

11 NOV. 2015



Proyecto de Rótulo Externo Genetic Sequencing Instrument MiSeqDx (DX-410-1001)

illumina®
www.illumina.com

REF DX-410-1001

MW 2012-11-12

~ Line: 100V-240V 50/60z 400W

CONTAINS FCC ID: ZWF-MISEQ

EC REP Emerge Europe
Moenstraat 15
2513 BH The Hague
The Netherlands

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA

LABEL PN: 15038775 Rev A

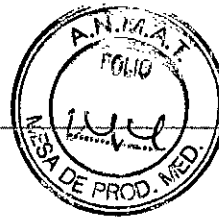
Patent www.illumina.com/patents

CE, !, 10, X, N135, IVD, MiSeqDx™

Importado por:
BioSystems S.A
Domicilio: **Av. Dorrego 673**
Tel. **54-011-4854-7775**
Directora Técnica: **Farm. Silvina Zanela**
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:

Lic. Alejandro Diez
Boderda
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



illumina

9442

Instrumento MiSeqDx™

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

N.º de catálogo DX-410-1001

Uso previsto

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

Principios del procedimiento

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

Limitaciones del procedimiento

- 1 Para uso diagnóstico *in vitro*.
- 2 Este producto ofrece lo siguiente:
 - Rendimiento de secuenciación: Más de 1 Gb
 - Lecturas: Más de 3 millones
 - Longitud de lectura (en experimento "paired-end"): 2 x 150 bp
 - Bases por encima de Q30: Más de 75 % (más de un 75 % de las bases tiene una puntuación de calidad según la escala de Phred superior a 30, lo que implica una precisión de llamada de bases superior al 99,9 %)
- 3 Las variantes en experimentos homopoliméricos de más de ocho bases se filtrarán en los archivos VCF (filtro R8).
- 4 Se ha validado el sistema para la detección de variantes de nucleótido único y deleciones de hasta tres bases. La evaluación de inserciones de una base se ha limitado a tres inserciones diferentes en tres cromosomas independientes.

Febrero de 2014

N.º de referencia 15050260 Rev. A ESP | 1

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



- 5 El sistema presenta problemas a la hora de detectar deleciones o inserciones de una base en tráctos homopoliméricos como, por ejemplo, poli-A.
- 6 El sistema MiSeqDx se ha diseñado para ofrecer resultados cualitativos (es decir, de genotipo).
- 7 Al igual que con cualquier flujo de trabajo basado en hibridación, los polimorfismos o las mutaciones subyacentes en regiones de ligadura de oligonucleótidos pueden afectar a los alelos que se estén comprobando y, en consecuencia, a las llamadas realizadas.
- 8 La cobertura mínima recomendada por amplicón necesaria para obtener una llamada de variantes precisa ($Q(\max_gt \mid \text{poly_site}) \geq 100$) es de 75x.

Componentes del producto

MiSeqDx de Illumina consta de lo siguiente:

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

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

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

Almacenamiento y manipulación

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

Materiales y equipo necesarios no suministrados

Consumibles de secuenciación

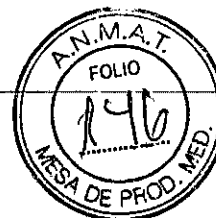
MiSeqDx Universal Kit 1.0 (n.º de catálogo DX-103-1001)

2 | N.º de referencia 15050260 Rev. A ESP

Febrero de 2014

Lic. Alejandro Diez
Aprobado
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



9442

Consumibles proporcionados por el usuario

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

Consumible	Finalidad
Paños humedecidos en alcohol isopropilo al 70 % o etanol al 70 %	Limpieza del soporte de la celda de flujo
Toallita de laboratorio sin pelusa	Limpieza de la platina de la celda de flujo
Toallitas limpiantes de 4 pulg. x 6 pulg.	Limpieza de la celda de flujo
Tween 20	Lavado del instrumento
Pinzas de plástico de punta cuadrada (opcionales)	Extracción de la celda de flujo del contenedor de transporte de celdas de flujo
Agua sin ARNasa ni ADNasa	Lavado del instrumento

Directrices para el agua sin ARNasa ni ADNasa

Utilice siempre agua sin ARNasa ni ADNasa para los procedimientos del instrumento. No utilice nunca agua de grifo ni desionizada. Cualquiera de los siguientes son ejemplos aceptables:

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

Advertencias y precauciones



PRECAUCIÓN

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

- 1 Algunos componentes de los reactivos proporcionados por Illumina para su utilización con el instrumento MiSeqDx contienen formamida, una amida alifática que es una toxina reproductiva probable. Consulte los prospectos de los productos correspondientes para obtener más información. Evite su inhalación o ingestión, o el contacto con la piel o los ojos, pues podrían producirse lesiones. Deseche los contenedores y los contenidos no utilizados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona. Para obtener más información, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
- 2 Algunos componentes de los kits de reactivos proporcionados por Illumina contienen 2-mercaptoetanol, un agente reductor. Consulte los prospectos de los productos correspondientes para obtener más información. Evite su inhalación o ingestión, o el contacto con la piel o los ojos, pues podrían producirse lesiones. Utilice el kit en un área bien ventilada y deseche los contenedores y los contenidos no utilizados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona. Para obtener más información, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
- 3 Manipule todas las muestras como si fueran agentes potencialmente infecciosos.
- 4 El incumplimiento de los procedimientos descritos puede provocar resultados erróneos o una reducción considerable de la calidad de las muestras.
- 5 Tenga en cuenta las precauciones habituales 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 los reactivos del kit. Lávese bien las manos tras la manipulación de muestras y reactivos del kit.

Febrero de 2014

Lia. Alejandro Diez
Apostado
BioSystems S.A.

N.º de referencia: 15050260 Rev. A ESP | 3

Dr. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



- 6 Se precisa seguir 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 arrojar resultados poco precisos y fiables.
- 7 Para evitar la contaminación, asegúrese de que las áreas de preamplificación y posamplificación dispongan de equipos especializados (tales como pipetas, puntas de pipetas, mezcladores vorticiales y centrifugadoras).
- 8 El emparejamiento de muestras de índice debe coincidir exactamente con la hoja de muestras. Las incoherencias entre la hoja de muestras y la disposición de placas provocará la pérdida de identificación de muestras positivas y la generación de informes con resultados incorrectos.
- 9 Durante el paso de normalización de bibliotecas del prospecto del reactivo correspondiente, es muy importante resuspender por completo el pellet de las bolas de la biblioteca. Esto resulta fundamental para lograr una densidad de grupos homogénea en la celda de flujo de MiSeqDx.
- 10 Cumpla los tiempos de incubación especificados en los pasos de normalización de bibliotecas tal y como se describe en el prospecto del reactivo correspondiente. Una incubación inadecuada puede afectar a la representación de bibliotecas y la densidad de grupos.
- 11 Se recomienda encarecidamente instalar un software antivirus proporcionado por el usuario para proteger el ordenador frente a virus informáticos. Consulte el manual del usuario para obtener instrucciones acerca de la instalación.
- 12 No utilice el instrumento MiSeqDx con ningún panel extraído. La utilización del instrumento con alguno de estos paneles retirados constituye una posible exposición a la tensión de línea, así como a tensiones de CC.
- 13 No toque la platina de la celda de flujo del compartimento de la celda de flujo. El calentador de este compartimento funciona a una temperatura entre 22 °C y 95 °C, por lo que podría causar quemaduras.
- 14 El instrumento pesa aproximadamente 57 kg (126 libras) y podría provocar lesiones graves si se cae o se maneja de forma indebida.

Notas del procedimiento

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



NOTA

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

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

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

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



Instrucciones de uso

De acuerdo con las siguientes instrucciones de uso del instrumento MiSeqDx, se deben utilizar los reactivos proporcionados en el MiSeqDx Universal Kit 1.0.

Preparación de la hoja de muestras de MiSeqDx

- 1 En la pantalla Welcome (Bienvenida) de Gestor de la lista de trabajos de Illumina, seleccione **Create Worklist** (Crear lista de trabajo).
- 2 En el campo Test Type (Tipo de prueba), seleccione **MiSeqDx Universal**.
- 3 En el campo Worklist Name (Nombre de la lista de trabajo), introduzca un nombre para la hoja de muestras.
 - Si se usa el ID alfanumérico del código de barras del cartucho de reactivo para el nombre de la hoja de muestras, el Software operativo de MiSeq (MOS) encontrará la hoja de muestras automáticamente.
 - Si se asigna otro nombre a la hoja de muestras, se puede usar el botón **Browse** (Examinar) del Software operativo de MiSeq (MOS) para localizar la hoja de muestras correspondiente.
- 4 [Opcional] Escriba una descripción para identificar el experimento.
- 5 Asegúrese de que la fecha coincida con la fecha de inicio del experimento.
- 6 Seleccione **Next** (Siguiente).

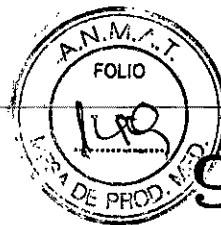
Introducción de información de la muestra

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

Preparación de muestras

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

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



Preparación del cartucho de reactivo

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

Inspección del cartucho de reactivo

- 1 Invierta el cartucho de reactivo diez veces para mezclar los reactivos descongelados y, a continuación, compruebe visualmente que todas las posiciones estén descongeladas.



NOTA

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

- 2 Inspeccione visualmente el reactivo de la posición 1 para asegurarse de que se haya mezclado completamente y no presente precipitados.
- 3 Golpee suavemente el cartucho en la mesa para reducir las burbujas de aire en los reactivos.



NOTA

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

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

Preparación de muestras para secuenciación

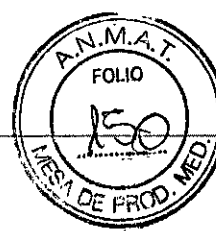
- 1 Deje que el Tampón de dilución de biblioteca alcance la temperatura ambiente. Agite el Tampón de dilución de biblioteca y asegúrese de que todos los precipitados se hayan disuelto por completo.
- 2 Si la placa **SGP** se ha almacenado congelada, descongéla a temperatura ambiente.
- 3 Centrifugue la placa **SGP** a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- 4 Disponga un tubo Eppendorf nuevo (en adelante, tubo **PAL**).
- 5 Determine las muestras que se deben agrupar para la secuenciación. Es posible agrupar un máximo de 48 muestras para su secuenciación.
- 6 Si la placa **SGP** se ha almacenado congelada, mezcle cada biblioteca que se deba secuenciar pipeteando arriba y abajo entre tres y cinco veces.
- 7 Transfiera 5 µl de cada biblioteca que se deba secuenciar de la placa **SGP**, columna por columna, a una gradilla de ocho tubos de PCR. Selle la placa **SGP** con un sello adhesivo para placas y resérvela.



NOTA

Tras su uso, almacene la placa **SGP** sellada a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C. La placa **SGP** sellada permanece estable hasta tres días.

- 8 Combine y transfiera el contenido de la gradilla de ocho tubos de PCR al tubo **PAL**. Mezcle bien el tubo **PAL**.
- 9 Disponga un tubo Eppendorf nuevo (en adelante, tubo **DAL**).
- 10 Añada 585 µl de Tampón de dilución de biblioteca al tubo **DAL**.
- 11 Añada 6 µl de 20 pM de Control interno PhiX al tubo **DAL**. Pipetee arriba y abajo entre tres y cinco veces para enjuagar la punta y garantizar una transferencia completa.
- 12 Transfiera 9 µl de **PAL** al tubo **DAL** que contiene Tampón de dilución de biblioteca. Pipetee arriba y abajo entre tres y cinco veces para enjuagar la punta y garantizar una transferencia completa.



9442

- 13 Mezcle la **DAL** agitando el tubo tan rápido como pueda.
- 14 Centrifugue el tubo **DAL** a $1000 \times g$ a $20\text{ }^\circ\text{C}$ durante un minuto.
- 15 Incube el tubo **DAL** en un bloque de calor a $96\text{ }^\circ\text{C}$ durante dos minutos.
- 16 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.
- 17 Mantenga el tubo **DAL** en el baño de agua con hielo durante cinco minutos.

Carga de bibliotecas de muestras en cartuchos

- 1 Utilice una punta de pipeta de 1 ml independiente, limpia y vacía para perforar el sello metálico situado por encima del depósito del cartucho de reactivo etiquetado como **Load Samples** (Carga de muestras).
- 2 Pipetee $600\text{ }\mu\text{l}$ de las bibliotecas de muestra en el depósito **Load Samples** (Carga de muestras). Proceda con cuidado para evitar tocar el sello metálico al dispensar la muestra.
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.
- 3 Continúe directamente con los pasos de configuración del experimento con la interfaz del Software operativo de MiSeq (MOS).

Configuración del experimento

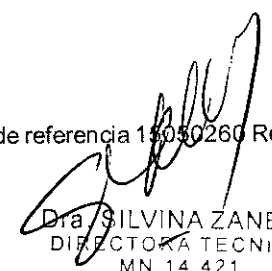
- 1 Inicie sesión en el Software operativo de MiSeq (MOS).
- 2 Seleccione **Sequence** (Secuenciar).
Se abrirá un conjunto de pantallas de configuración del experimento en el siguiente orden: Select Run Type (Seleccionar tipo de experimento), Load Flow Cell (Cargar celda de flujo), Load Reagents (Cargar reactivos), Review (Revisar) y Pre-Run Check (Comprobación previa al experimento).
- 3 Seleccione **Diagnostic Run** (Experimento diagnóstico).
- 4 Cuando aparezca la pantalla Load Flow Cell (Cargar celda de flujo), limpie la celda de flujo y, después, cárguela.
- 5 Cierre la puerta del compartimento de la celda de flujo y el cierre de la celda de flujo.
Tanto el cierre como la puerta del compartimento deben estar cerrados antes de iniciar el experimento. Cuando la celda de flujo está cargada, el software lee y registra la RFID. Aparecerá una confirmación de que la RFID se ha leído correctamente en la esquina inferior derecha de la pantalla.
- 6 Cuando aparezca la pantalla Load Reagents (Cargar reactivos), vacíe la botella de residuos, cargue la botella de Solución SBS de MiSeqDx (PR2) y, a continuación, cargue el cartucho de reactivo.
Cuando la botella de solución SBS de MiSeqDx (PR2) y el cartucho de reactivo están cargados, el software lee y registra la RFID. Aparecerá una confirmación de que la RFID se ha leído correctamente en la esquina inferior derecha de la pantalla.
- 7 Seleccione la hoja de muestras correspondiente.
El software buscará de forma predeterminada un archivo de hoja de muestras cuyo nombre coincida con el número del código de barras del cartucho de reactivo cargado en el instrumento.
- 8 Confirme la configuración del experimento y los resultados de la comprobación previa al experimento.
- 9 Inicie el experimento.
La pantalla Sequencing (Secuenciación) se abre cuando empieza el experimento. Esta pantalla proporciona una representación visual del experimento en curso, incluidas las intensidades y las puntuaciones de calidad (puntuaciones Q).

Febrero de 2014

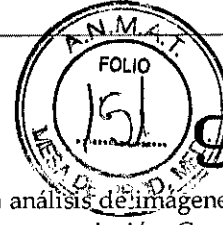


Lic. Alejandro Diez
Asesorado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15050260 Rev. A ESP | 7



Dra. SILVINA ZANELLA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



9442

Resultados

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

Demultiplexado

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

Generación de archivos FASTQ

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

Alineación

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

Llamadas de variantes

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

Características de rendimiento

Precisión

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

Estudio 1

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

Los resultados de este estudio se muestran a continuación.

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

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

Lic. Alejandro Díez
 Apoyado
 Biosystems S.A.

Dra. Silvina Zanella
 Directora Técnica
 IN 14 421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Lic. Alejandro Díez
 Responsable
 Biosystems S.A.

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
17	3	117	-	13	15	117	0	117	0	100
18	3	136	Poli-T (5)	13	15	136	0	136	0	100
19	3	131	Poli-T (5), SNV	13	15	131	0	131	0	100
20	3	123	Poli-A (5)	13	15	123	0	123	0	100
21	3	117	Poli-A (6), Poli-T (5), Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	117	0	117	0	100
22	3	119	Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	119	0	119	0	100
23	3	120	-	13	15	120	0	120	0	100
24	3	129	Poli-T (5)	13	15	129	0	129	0	100
25	4	133	Poli-C (7), 66 % GC	13	15	133	0	133	0	100
26	4	135	Poli-C (5), 69 % GC	13	15	135	0	135	0	100
27	4	123	SNV	13	15	123	0	123	0	100
28	4	134	-	13	15	134	0	134	0	100
29	4	132	-	13	15	132	0	132	0	100

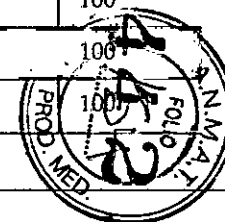
Dra SILVINA LANZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 IN 14.471
 BIOSYSTEMS S.A.

9442
 FOLIO 153
 MED

Dr. Alejandro Píez
 Responsable
 Biosystems S.A.

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
30	4	121	Poli-A (5), SNV	13	15	121	0	121	0	100
31	4	125	-	13	15	125	0	125	0	100
32	4	134	Poli-T (5)	13	15	134	0	134	0	100
33	4	118	-	13	15	118	0	118	0	100
34	4	122	Poli-A (5)	13	15	122	0	122	0	100
35	4	131	-	13	15	131	0	131	0	100
36	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
37	4	128	Poli-T (6)	13	15	128	0	128	0	100
38	4	131	-	13	15	131	0	131	0	100
39	4	129	Poli-A (5), Poli-T (5), SNV	13	15	129	0	129	0	100
40	4	133	Poli-T (5), SNV	13	15	133	0	133	0	100
41	4	112	SNV	13	15	112	0	112	0	100
42	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
43	4	135	-	13	15	135	0	135	0	100
44	4	122	-	13	15	122	0	122	0	100
45	4	117	-	13	15	117	0	117	0	100

Dra. Silvia Paz Zañeña
 Directora Técnica
 Biosystems S.A.

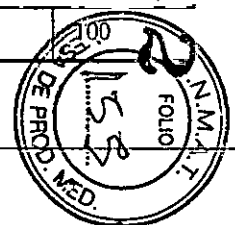


Lid. Alejandro Díez
 Responsable de
 Biosystems S.A.

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
46 ⁹	4	124	-	13	15	125	0	125	0	100
47	4	117	Poli-T (5)	13	15	117	0	117	0	100
48	4	128	Poli-A (7)	13	15	128	0	128	0	100
49	4	123	Poli-A (6)	13	15	123	0	123	0	100
50	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
51	4	112	-	13	15	112	0	112	0	100
52	4	129	-	13	15	129	0	129	0	100
53	4	126	-	13	15	126	0	126	0	100
54	4	132	-	13	15	132	0	132	0	100
55	5	131	-	13	15	131	0	131	0	100
56	5	119	-	13	15	119	0	119	0	100
57	5	120	Poli-A (5)	13	15	120	0	120	0	100
58	5	119	-	13	15	119	0	119	0	100
59	5	118	-	13	15	118	0	118	0	100
60	5	112	-	13	15	112	0	112	0	100
61	5	120	-	13	15	120	0	120	0	100
62	5	120	Poli-A (5)	13	15	120	0	120	0	100
63	5	115	CT(5)	13	15	115	0	115	0	100

944

Dr. SILVANA ZANELA
 Responsable de
 Biosystems S.A.



Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 Biosystems S.A.

Amplificón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplificón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
64	5	112	SNV	13	15	112	0	112	0	100
65	5	135	Poli-T (6)	13	15	135	0	135	0	100
66	5	131	63 % GC	13	15	131	0	131	0	100
67	5	121	-	13	15	121	0	121	0	100
68	5	132	Poli-A (6), Poli-T (8)	13	15	132	0	132	0	100
69	7	133	-	13	15	133	0	133	0	100
70	7	120	60 % GC	13	15	120	0	120	0	100
71	7	135	-	13	15	135	0	135	0	100
72	7	126	Poli-A (5), 59 % GC	13	15	126	0	126	0	100
73	7	134	-	13	15	134	0	134	0	100
74	7	122	Poli-C (5), 63 % GC	13	15	122	0	122	0	100
75	7	127	59 % GC; SNV	13	15	127	0	127	0	100
76	7	123	-	13	15	123	0	123	0	100
77	7	125	-	13	15	125	0	125	0	100
78	7	133	Poli-A (5), Poli-T (5)	13	15	133	0	133	0	100

9442



DRG. SIMONA ZANELLA
 BIOLÓGICA
 BIOSYSTEMS S.A.

Dr. Alejandro Díaz
 Responsable
 Biosystems S.A.

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
79	7	116	-	13	15	116	0	116	0	100
80	7	135	-	13	15	135	0	135	0	100
81	7	118	-	13	15	118	0	118	0	100
82	7	136	67 % GC	13	15	136	0	136	0	100
83	7	131	58 % GC	13	15	131	0	131	0	100
84	7	119	Poli-G (6), 61 % GC	13	15	119	0	119	0	100
85	7	122	Poli-T (5)	13	15	122	0	122	0	100
86	7	123	Poli-A (6)	13	15	123	0	123	0	100
87	8	127	60 % GC	13	15	127	0	127	0	100
88	8	129	57 % GC	13	15	129	0	129	0	100
89	9	130	Poli-T (5)	13	15	130	0	130	0	100
90	9	116	-	13	15	116	0	116	0	100
91	9	119	Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	119	0	119	0	100
92	9	121	-	13	15	121	0	121	0	100
93	9	117	Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	117	0	117	0	100
94	9	114	-	13	15	114	0	114	0	100

Dr. SILVIA ZANIELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 14/11/21
 BIOSYSTEMS S.A.



0442

Lic. Alejandro Díez
 Responsable
 Biosystems S.A.

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
95 ¹⁰	9	129	Poli-A (14)	13	15	130	0	129 (de 130)	15	99,23
96	9	114	Región homóloga en un cromosoma diferente; SNV	13	15	114	0	114	0	100
97	9	122	-	13	15	122	0	122	0	100
98	9	127	Poli-A (5), Poli-C (5)	13	15	127	0	127	0	100
99	9	133	-	13	15	133	0	133	0	100
100	9	138	64 % GC	13	15	138	0	138	0	100
101	9	139	-	13	15	139	0	139	0	100
102	9	116	-	13	15	116	0	116	0	100
103	9	133	Poli-A (5), 57 % GC	13	15	133	0	133	0	100
104	9	138	57 % GC	13	15	138	0	138	0	100
105	9	136	Poli-C (5), 67 % GC	13	15	136	0	136	0	100
106	9	118	70 % GC	13	15	118	0	118	0	100
107	10	128	62 % GC	13	15	128	0	128	0	100
108	10	120	60 % GC	13	15	120	0	120	0	100

Dra. SILVIA MANUELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 44421
 BIOSYSTEMS S.A.

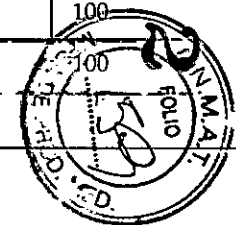
94421



Lic. Alejandro Diez
 LABORATORIO
 BIOSYSTEMS S.A.

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

94426



Dra. SILVANA ANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 M. 14421
 BIOSYSTEMS S.A.

Dr. Alejandro Diez
Aboderado
BioSystems S.A.

Amplificón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplificón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
123	10	129	58 % GC	13	15	129	0	129	0	100
124	11	117	Poli-T (10)	13	15	117	0	117	0	100
125	11	117	Poli-T (5)	13	15	117	0	117	0	100
126	11	113	Poli-A (5)	13	15	113	0	113	0	100
127	11	129	-	13	15	129	0	129	0	100
128	11	121	Poli-T (5)	13	15	121	0	121	0	100
129	11	123	-	13	15	123	0	123	0	100
130	11	127	Poli-A (6)	13	15	127	0	127	0	100
131	11	136	Poli-T (6)	13	15	136	0	136	0	100
132	11	132	Poli-T (5)	13	15	132	0	132	0	100
133	11	115	-	13	15	115	0	115	0	100
134	11	117	Poli-T (8); 19 % GC	13	15	117	0	117	0	100
135	11	134	Poli-A (5); Poli-T (5)	13	15	134	0	134	0	100
136	11	131	Poli-A (5)	13	15	131	0	131	0	100
137	11	133	26 % GC; SNV	13	15	133	0	133	0	100
138	11	137	Poli-T (8); SNV	13	15	137	0	137	0	100

Dr. Silvia Zanella
Directora Técnica
BioSystems S.A.



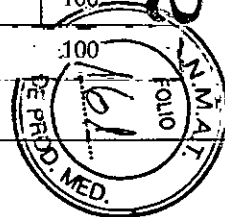
9476

Lia Aljando Diez
 Responsable
 Biosystems S.A.

Amplificación	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplificación	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
139	11	131	Poli-A (5)	13	15	131	0	131	0	100
140	12	131	-	13	15	131	0	131	0	100
141	12	128	-	13	15	128	0	128	0	100
142	12	133	Poli-A (5)	13	15	133	0	133	0	100
143	12	136	-	13	15	136	0	136	0	100
144	12	124	-	13	15	124	0	124	0	100
145	12	122	59 % GC	13	15	122	0	122	0	100
146	13	122	-	13	15	122	0	122	0	100
147	13	116	Poli-C (5)	13	15	116	0	116	0	100
148	13	133	-	13	15	133	0	133	0	100
149	13	117	SNV	13	15	117	0	117	0	100
150	13	124	Poli-T (6)	13	15	124	0	124	0	100
151	13	123	Poli-T (5); 26 % GC	13	15	123	0	123	0	100
152	13	115	Poli-A (5)	13	15	115	0	115	0	100
153	13	125	-	13	15	125	0	125	0	100
154	13	121	-	13	15	121	0	121	0	100
155	13	123	-	13	15	123	0	123	0	100
156	13	114	-	13	15	114	0	114	0	100

DR. SILVIA VILLANZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 AN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Lidia Alejandra Diez
 Lidia Alejandra Diez
 Responsable de Calidad
 Biosystems S.A.

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
157	13	119	-	13	15	119	0	119	0	100
158	14	122	58 % GC	13	15	122	0	122	0	100
159	16	122	-	13	15	122	0	122	0	100
160	16	121	-	13	15	121	0	121	0	100
161	16	123	Poli-C (5)	13	15	123	0	123	0	100
162	17	119	-	13	15	119	0	119	0	100
163	17	119	61 % GC	13	15	119	0	119	0	100
164	17	135	-	13	15	135	0	135	0	100
165	17	116	Poli-C (6); 60 % GC; SNV	13	15	116	0	116	0	100
166	17	123	-	13	15	123	0	123	0	100
167	17	116	62 % GC	13	15	116	0	116	0	100
168	17	118	Poli-C (5); 65 % GC	13	15	118	0	118	0	100
169	17	129	-	13	15	129	0	129	0	100
170	17	131	Poli-G (6); 67 % GC; SNV	13	15	131	0	131	0	100
171	17	127	61 % GC	13	15	127	0	127	0	100

Diana Estefanía Zanella
 Diana Estefanía Zanella
 Directora Técnica
 Biosystems S.A.

9442

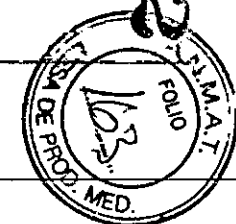


Lic. Alejandra Diez
Laboradora
Biosystems S.A.

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
172	17	118	Poli-C (5)	13	15	118	0	118	0	100
173	17	138	61 % GC	13	15	138	0	138	0	100
174	17	131	58 % GC	13	15	131	0	131	0	100
175	18	112	-	13	15	112	0	112	0	100
176	18	124	-	13	15	124	0	124	0	100
177	18	134	Poli-A (6)	13	15	134	0	134	0	100
178	18	129	-	13	15	129	0	129	0	100
179	18	133	-	13	15	133	0	133	0	100
180	18	118	-	13	15	118	0	118	0	100
181	18	114	60 % GC	13	15	114	0	114	0	100
182	18	118	-	13	15	118	0	118	0	100
183	19	122	Poli-G (6); 66 % GC	13	15	122	0	122	0	100
184	19	139	64 % GC	13	15	139	0	139	0	100
185	19	131	67 % GC	13	15	131	0	131	0	100
186	19	141	59 % GC; Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	141	0	141	0	100

9442

Dra. SILVANA ZANELA
DIRECCIÓN TÉCNICA
MN 1442
BIOSYSTEMS S.A.



[Handwritten Signature]
 Lic. Alejandro Diez
 Gerente
 Biosystems S.A.

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
187	19	121	Poli-C (5); 72 % GC; Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	121	0	121	0	100
188	19	138	58 % GC	13	15	138	0	138	0	100
189	19	123	64 % GC	13	15	123	0	123	0	100
190	19	138	-	13	15	138	0	138	0	100
191	20	117	Poli-T (5)	13	15	117	0	117	0	100
192	22	136	Poli-A (7)	13	15	136	0	136	0	100
193	22	122	Poli-A (5); Poli-C (5)	13	15	122	0	122	0	100
194	22	122	62 % GC; SNV	13	15	122	0	122	0	100
195	22	119	66 % GC	13	15	119	0	119	0	100

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

² El número total de muestras enumeradas es 15 porque dos de las 13 muestras únicas analizadas se procesaron en dos duplicados independientes.

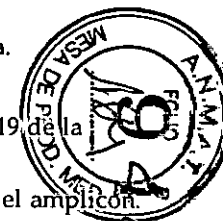
³ El número de muestras o llamadas que se pudo realizar es el número de bases que presentaban una calidad adecuada para que el sistema las llamara.

⁴ El número de ausencia de llamadas es el número de bases de un amplicón que genera una ausencia de llamada en el experimento.

⁵ El número de llamadas correctas por muestra es el número de bases del amplicón llamadas que arrojaron resultados que coincidían con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano y la referencia compuesta bien definida.

⁶ El número de llamadas incorrectas fue el número total de llamadas incorrectas de SNV (variantes de nucleótido único) o inserciones y deleciones en el amplicón. Se incluyen más detalles sobre las llamadas incorrectas en las siguientes notas al pie.

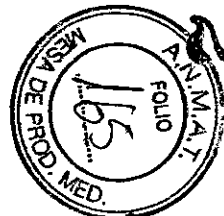
[Handwritten Signature]
 Dra. Silvia Zanella
 Directora Técnica
 Biosystems S.A.



Lic. Melipodio Diez
Kopelberg
BioSystems S.A.

- 7 El porcentaje de llamadas correctas es igual al índice de llamadas correctas de todas las bases del amplicón, donde la llamada correcta de las SNV (variantes de nucleótido único) o inserciones y deleciones se basa en información de referencia compuesta bien definida, y la llamada correcta de las bases en el resto de la secuencia del amplicón se basa en la comparación con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano. Esta columna puede incluir más de un resultado esperado para un amplicón dado si algunas de las muestras contienen una inserción/delección y otras no como, por ejemplo, el amplicón 9. El porcentaje de llamadas correctas de muestras con resultado incorrecto se muestra en la tabla.
- 8 El amplicón 9 incluye un experimento homopolimérico de 14 bases A de acuerdo con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano. No obstante, la información de referencia compuesta bien definida para 7 de 13 muestras tiene 13 bases A en este experimento homopolimérico. En estas siete muestras, esta delección de un par de bases representa un falso negativo en el estudio de precisión de la secuenciación de MiSeqDx.
- 9 El amplicón 46 incluye una inserción de una base que se muestra en 9 muestras en la base de datos de referencia bien definida y se detecta correctamente en todas las muestras analizadas.
- 10 El amplicón 95 incluye un experimento homopolimérico de 14 bases A de acuerdo con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano. No obstante, las secuencias de referencia compuesta bien definidas para 13 de 13 muestras tienen 15 bases A en este experimento homopolimérico. En estas 13 muestras, esta inserción de un par de bases representa un falso negativo en el estudio de precisión de la secuenciación de MiSeqDx.

DR. S. DIVINAZANIELA
DIRECCIÓN TÉCNICA
MN 14 421
BIOSYSTEMS S.A.



9442



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

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

Muestra	N.º de amplicones	% de cobertura de amplicones ¹	Variantes esperadas por muestra ²	Variantes llamadas correctamente	Variantes perdidas ³	Bases no variantes llamadas correctamente	Coincidencia de porcentaje positivo ⁴ (%)	Coincidencia de porcentaje negativo ⁵ (%)
NA12877	195	100	19	17	2	24 418	89,47	100
NA12878	195	100	19	17	2	24 417	89,47	100
NA12879	195	100	20	19	1	24 416	95,00	100
NA12880	195	100	20	18	2	24 417	90,00	100
NA12881	195	100	22	20	2	24 415	90,91	100
NA12882	195	100	16	15	1	24 419	93,75	100
NA12883	195	100	24	23	1	24 412	95,83	100
NA12884	195	100	21	20	1	24 415	95,24	100
NA12885	195	100	19	17	2	24 417	89,47	100
NA12886	195	100	22	20	2	24 415	90,91	100
NA12887	195	100	19	18	1	24 416	94,74	100
NA12888	195	100	24	23	1	24 412	95,83	100
NA12893	195	100	20	18	2	24 417	90,00	100

¹ El porcentaje de cobertura de amplicones es el número de bases de los amplicones secuenciados con confianza.

² Entre las variantes esperadas por muestra se incluyen tanto las variantes de nucleótido único como las inserciones y delecciones.

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

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

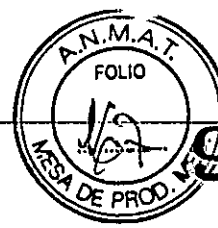
⁵ Coincidencia de porcentaje negativo (NPA) = $100 \times TN / (FP + TN)$, donde los falsos positivos (FP) son el número de llamadas de variantes positivas en coordenadas genómicas donde las variantes están ausentes de acuerdo con la secuencia de referencia, o si el alelo mutante llamado no concuerda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

Febrero de 2014

N.º de referencia 15050260 Rev. A ESP | 23

Lic. Alejandro Díez
Aprobado
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14 421
BIOSYSTEMS S.A.



9442

Estudio 2

Los resultados de la secuenciación del panel del amplicón anterior se compararon con un genotipo muy seguro definido para la NA12878 por el instituto de estándares y tecnología de EE. UU., National Institute of Standards and Technology (NIST) (v.2.15¹). De los 195 amplicones, 184 se encontraban dentro de llamadas de referencia muy seguras de la secuencia del NIST y se compararon. Las llamadas de bases no variantes se compararon con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano.

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

Muestra	N.º de amplicones	% de cobertura de amplicones ²	Variantes esperadas	Variantes llamadas correctamente	Variantes perdidas	Bases no variantes llamadas correctamente	Coincidencia de porcentaje positivo ³ (%)	Coincidencia de porcentaje negativo ⁴ (%)
NA12878	184	100	17	16	1 ⁵	23 066	94,12	100

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

² El porcentaje de cobertura de amplicones es el número de bases de los amplicones secuenciados con confianza.

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

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

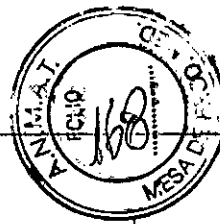
⁵ La variante perdida es la delección de un par de bases en el amplicón 9 durante el experimento homopolimérico de 14 bases A no llamadas por el instrumento MiSeqDx que está presente en la secuencia del NIST. Tenga en cuenta que la secuencia del NIST no incluye la inserción de un par de bases en el otro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

Estudio 3

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

Tabla 1 Resumen de la detección de inserciones y delecciones con la plataforma MiSeqDx

Amplificación	Tamaño de fragmento	Contenido genómico del amplicón	N.º de llamadas/ muestra que se pudo realizar	N.º de bases llamadas/ muestra	N.º de ausencia de llamadas	N.º de llamadas correctas/ muestra	N.º de llamadas incorrectas	% de llamadas correctas
1	129	Inserción de una base	130	130	0	130	0	100
2	154	Delección de tres bases	151	151	0	151	0	100
3	167	Delección de dos bases	165	165	0	165	0	100



9442

Ampli- ción	Tamaño de fragmen- to	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de llama- das/ muestra que se pudo realizar	N.º de bases llamadas/ muestra	N.º de ausencia de llama- das	N.º de llamadas correctas/ muestra	N.º de llama- das incorec- tas	% de llama- das correc- tas
4	134	Deleción de una base	133	133	0	133	0	100
5	132	Deleción de una base	131	131	0	131	0	100
6	129	Deleción de una base	128	128	0	128	0	100

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

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

Reproducibilidad

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

Febrero de 2014

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15050260 Rep. A GSP | 25

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14 421
BIOSYSTEMS S.A.



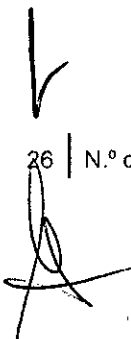
9442


Estudio 1

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

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

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


Lic. Alejandro Drez
Apoderado
BioSystems S.A.


Febrero de 2014
Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

Dra. S. VAZQUEZ
 DIRECTORA TÉCNICA
 14 41
 BIOSYSTEMS S.A.

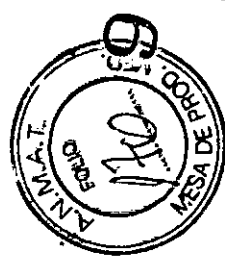
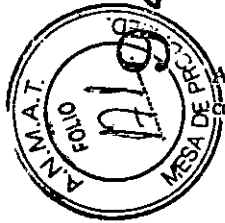


Tabla 5 Resultados de reproducibilidad entre instrumentos del estudio 1 de la plataforma MiSeqDx (nivel del amplión)

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

Dra. Alejandra Diez
 Apoderada
 Biosystems S.A.

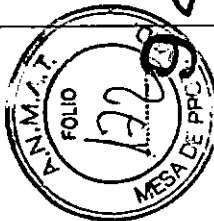


442

Ampli- con	Cromoso- ma	Tamaño del fragen- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de mues- tras procesa- das ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵
14	3	131	Poli-A (5); Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
15	3	130	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
16	3	130	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
17	3	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
18	3	136	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
19	3	131	Poli-T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
20	3	123	Poli-A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
21	3	117	Poli-A (6); Poli-T (5); Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
22	3	119	Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Dra. ANA ZANELA
DIRECCIÓN TÉCNICA
N.º 1472
BIOSYSTEMS S.A.

Dic. Alejandro Diez
Biosystems S.A.



42
42

Dr. SILVANO J. ANEJA
DIRECTOR TÉCNICO
MIN 4.421
BIOSYSTEMS S.A.

Ampliación	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplificación	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
				N.º de muestras procesadas ²	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵	N.º total de ausencia de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵	N.º total de ausencia de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵
23	3	120	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
24	3	129	Poli-T (5)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
25	4	133	Poli-C (7); 66 % GC	135	0	100	0	0	100	0	0	100
26	4	135	Poli-C (5); 69 % GC	135	0	100	0	0	100	0	0	100
27	4	123	SNV	135	0	100	0	0	100	0	0	100
28	4	134	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
29	4	132	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
30	4	121	Poli-A (5); SNV	135	0	100	0	0	100	0	0	100
31	4	125	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
32	4	134	Poli-T (5)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
33	4	118	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
34	4	122	Poli-A (5)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
35	4	131	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
36	4	133	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100

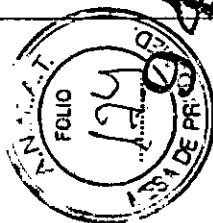
[Signature]
Dr. Alejandro Diez
Biosystems S.A.



Dra. SILVIA AZUAGA
 DIRECTORA TÉCNICA
 N.º 1942
 BIOSYSTEMS S.A.

Ampliación	Cromosoma	Número del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del ampliación	N.º de muestras procesadas ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausencia de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵	N.º total de ausencia de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵	N.º total de ausencia de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵
37	4	128	Poli-T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
38	4	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
39	4	129	Poli-A (5); Poli-T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
40	4	133	Poli-T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
41	4	112	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
42	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
43	4	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
44	4	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
45	4	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
46	4	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
47	4	117	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
48	4	128	Poli-A (7)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
49	4	123	Poli-A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
50	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

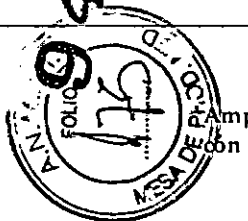
Lic. Alejandro Díez
 Apogeo
 Biosystems S.A.



Dra. SILVANA ANEFA
DIRECTORA TECNICA
MN 147
BIOSYSTEMS S.A.

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

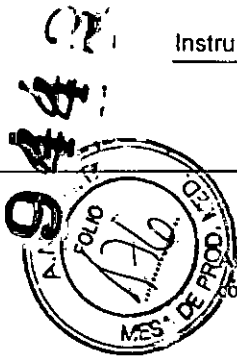
Lic. Alejandro Diez
Aprobado
BIOSYSTEMS S.A.



Amplificación	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplificación	N.º de muestras procesadas ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausencias de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵	N.º total de ausencias de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵	N.º total de ausencias de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵
	5	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	5	132	Poli-A (6); Poli-T (8)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	7	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	7	120	60 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	7	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	7	126	Poli-A (5); 59 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	7	134	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	7	122	Poli-C (5); 63 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	7	127	59 % GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	7	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	7	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	7	133	Poli-A (5); Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	7	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Dr. SILVIA ZANZALEA
DIRECTORA DE CALIDAD
MEXICO
BIOSYSTEMS S.A.

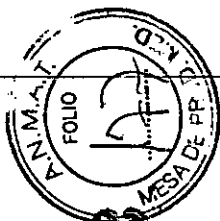
Lic. Alejandro Díez
Integrado
Biosystems S.A.



DIRECTOR GENERAL DE SISTEMAS DE INFORMACIÓN TECNOLÓGICA
 MEXICO
 BIOSYSTEMS S.A.

Ampli- con	Cromoso- ma	Tamaño del fragmen- to analiza- do	Contenido genómico del ampli- con	N.º de mues- procesa- das ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵
80	7	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
81	7	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
82	7	136	67 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
83	7	131	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
84	7	119	Poli-G (6); 61 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
85	7	122	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
86	7	123	Poli-A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
87	8	127	60 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
88	8	129	57 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
89	9	130	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
90	9	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
91	9	119	Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
92	9	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Lic. Meléndez Diez
 Abogado
 BIOSYSTEMS S.A.

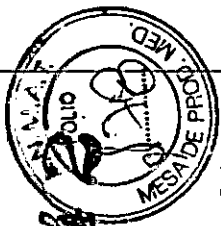


9442

Ampli- ción	Cromoso- ma	Tamaño del fragmen- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de mues- tras procesa- das ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵
93	9	117	Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
94	9	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
95	9	129	Poli-A (14)	135	0	45 ⁶	99,22	0	45 ⁶	99,22	0	45 ⁶	99,22
96	9	114	Región homóloga en un cromosoma diferente; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
97	9	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
98	9	127	Poli-A (5); Poli-C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
99	9	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
100	9	138	64 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
101	9	139	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
102	9	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Dr. Alejandro Diez
DIRECCIÓN TÉCNICA
MEX 4 421
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez
BIOSYSTEMS S.A.

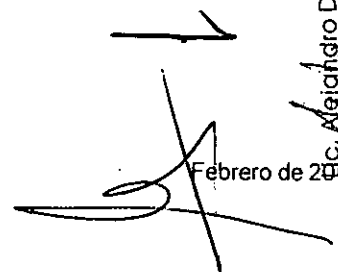


944

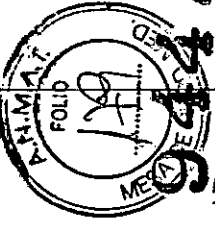
Ampli- ción	Cromoso- ma	Tamano del fragem- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de mues- procesa- das ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵
103	9	133	Poli-A (5); 57 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
104	9	138	57 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
105	9	136	Poli-C (5); 67 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
106	9	118	70 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
107	10	128	62 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
108	10	120	60 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
109	10	139	58 % GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
110	10	118	57 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
111	10	123	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
112	10	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
113	10	129	26 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
114	10	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

VIVIANA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 N.º 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

1



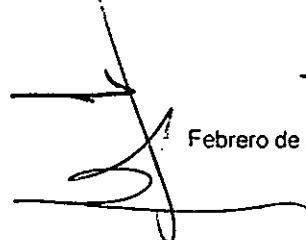
Alejandro Díez
 Director Técnico
 Biosystems S.A.



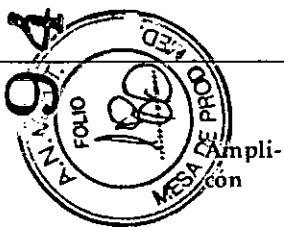
Ampli- ción	Cromoso- ma	Tamaño del fragmen- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de mues- tras procesa- das ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% llama- das corec- tas ⁵
115	10	124	Poli-T (5); Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
116	10	135	CA(4)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
117	10	135	Poli-A (6); Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
118	10	119	Poli-C (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
119	10	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
120	10	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
121	10	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
122	10	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
123	10	129	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
124	11	117	Poli-T (10)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Dra. Silvia ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 DIXE 01/01/2014 14:46:1
 BICSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Díez
 Agudado
 BICSYSTEMS S.A.


 Febrero de 2014

9442

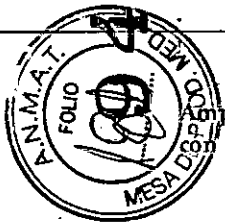


	Cromosoma	Número del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del ampliación	N.º de muestras procesadas ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausencia de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵	N.º total de ausencia de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵	N.º total de ausencia de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵
125	11	117	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
126	11	113	Poli-A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
127	11	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
128	11	121	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
129	11	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
130	11	127	Poli-A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
131	11	136	Poli-T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
132	11	132	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
133	11	115	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
134	11	117	Poli-T (8); 19 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
135	11	134	Poli-A (5); Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
136	11	131	Poli-A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
137	11	133	SNV; 26 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
138	11	137	Poli-T (8); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

[Handwritten signature]
Dra. SILVIA ZAFANELA
DIRECTORA TÉCNICA
AN 14.421
BIO SYSTEMS S.A.

Lid. Alejandro Díez
Apodado
Biosystems S.A.

[Handwritten signature]
Febrero de 2014

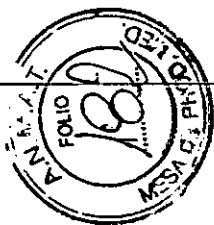


	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del ampliación	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
				N.º de muestras procesadas ²	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵	N.º total de ausencia de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵	N.º total de ausencia de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵
139	11	131	Poli-A (5)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
140	12	131	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
141	12	128	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
142	12	133	Poli-A (5)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
143	12	136	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
144	12	124	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
145	12	122	59 % GC	135	0	100	0	0	100	0	0	100
146	13	122	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
147	13	116	Poli-C (5)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
148	13	133	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
149	13	117	SNV	135	0	100	0	0	100	0	0	100
150	13	124	Poli-T (6)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
151	13	123	Poli-T (5); 26 % GC	135	0	100	0	0	100	0	0	100
152	13	115	Poli-A (5)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
153	13	125	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
154	13	121	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100

Dr. VIVIAN ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MI 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Díez
Abogado
BIOSYSTEMS S.A.

Febbrero de 2014



Ampliación

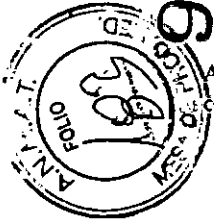
25742

Ampliación	Cromosoma	Número del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplificación	N.º de muestras procesadas ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausencia de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵	N.º total de ausencia de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵	N.º total de ausencia de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵
155	13	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
156	13	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
157	13	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
158	14	122	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
159	16	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
160	16	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
161	16	123	Poli-C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
162	17	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
163	17	119	61 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
164	17	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
165	17	116	Poli-C (6); 60 % GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
166	17	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
167	17	116	62 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
168	17	118	Poli-C (5); 65 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

MANUELA
DRA. EN GENÉTICA
DIRECTORA TÉCNICA
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Pérez
Asesor
Biosystems S.A.
Febrero de 2014

442



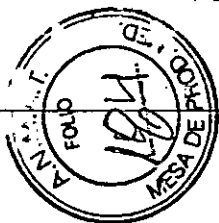
Ampliación

Ampliación	Cromosoma	Número del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplificación	N.º de muestras procesadas ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausencias de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵	N.º total de ausencias de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵	N.º total de ausencias de llamadas ³	N.º total de llamadas incorrectas ⁴	% de llamadas correctas ⁵
169	17	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
170	17	131	Poli-G (6); 67 % GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
171	17	127	61 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
172	17	118	Poli-C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
173	17	138	61 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
174	17	131	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
175	18	112	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
176	18	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
177	18	134	Poli-A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
178	18	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
179	18	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
180	18	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
181	18	114	60 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
182	18	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Dr. SILVANA ZANELLA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

[Handwritten signature]

Lic. Alejandro Pérez
N.º de identificación
BIOSYSTEMS S.A.



9442

Ampli- ción	Cromoso- ma	Tamaño del fragmen- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de muestras procesa- das ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵
183	19	122	Poli-G (6); 66 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
184	19	139	64 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
185	19	131	67 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
186	19	141	59 % GC; Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
187	19	121	Poli-C (5); 72 % GC; Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
188	19	138	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
189	19	123	64 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
190	19	138	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
191	20	117	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

[Handwritten Signature]
 Dra. Susana ZAYELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 M14 #21

BIOSYSTEMS S.A.

[Handwritten Signature]
 Lic. Alejandro Diez
 Responsable de la
 Biosystems S.A.
 Febrero de 2014



9442

Ampli- ción	Cromoso- ma	Tamaño del fragmen- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de mue- stras procesa- das ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corre- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corre- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corre- tas ⁵
192	22	136	Poli-A (7)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
193	22	122	Poli-A (5); Poli-C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
194	22	122	62 % GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
195	22	119	66 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

- ¹ "Fragmento analizado" se refiere al tamaño de la región genómica secuenciada en bases, sin incluir cebadores específicos según el objetivo.
- ² El número de muestras se calcula a partir de 9 experimentos de 15 muestras (11 muestras procesadas una vez y 2 procesadas dos veces).
- ³ El número total de ausencia de llamadas es el número combinado de ausencias de llamadas obtenido para los 45 experimentos mediante el análisis del amplicón específico con un instrumento MiSeqDx especificado.
- ⁴ El número total de llamadas incorrectas es el número combinado de llamadas incorrectas obtenido para los 45 experimentos mediante el análisis del amplicón específico con un instrumento MiSeqDx especificado.
- ⁵ El porcentaje de llamadas correctas es igual al índice de llamadas correctas de todas las bases del amplicón, donde la llamada correcta de las SNV (variantes de nucleótido único) o inserciones y deleciones se basa en la base de datos de referencia bien definida, y la llamada correcta de las bases en el resto de la secuencia del amplicón se basa en la comparación con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano. Esta columna puede incluir más de un resultado esperado para un amplicón dado si se espera que algunas de las muestras contengan una inserción/delección y otras no como, por ejemplo, el amplicón 9.
- ⁶ El amplicón 1 presentó un número de bases cuyo genotipo no se pudo llamar: 12 bases en 1/9 experimentos en NA12881; una base en 2/9 experimentos y tres bases en 1/9 experimentos en NA12886; 20 bases en 1/9 experimentos y 26 bases en 1/9 experimentos en NA12888. Esto se debe a una cobertura baja en bases con ausencia de llamadas de dichos experimentos, donde la profundidad de la secuenciación media fue de 33,2, con un mínimo de 21 y un máximo de 52.
- ⁷ Cuando no se incluyen ausencias de llamadas en el cálculo, el índice de llamadas correctas es del 100 %.
- ⁸ El amplicón 9 incluye un experimento homopolimérico de 14 bases A de acuerdo con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano. No obstante, la información de referencia bien definida para 7 de 13 muestras tiene 13 bases A en este experimento homopolimérico. En estas siete muestras, esta delección de un par de bases se llama falso negativo y, asimismo, falsos negativos reproducibles en los nueve experimentos.
- ⁹ El amplicón 95 incluye un experimento homopolimérico de 14 bases A de acuerdo con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano. No obstante, las secuencias de información de referencia bien definidas para 13 de 13 muestras tienen 15 bases A en este experimento homopolimérico. En estas 13 muestras, esta inserción de un par de bases no se llama de forma reproducible al 100 % (es decir, es un falso negativo).

Dr. ANABELA
DIRECCIÓN TÉCNICA
BIO SYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Pérez
Algoritmos
BioSystems S.A.

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

Tabla 1: Resumen de los resultados de reproducibilidad de la plataforma MiSeqDx de 13 muestras bien definidas

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

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

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

³ Las muestras NA12877 y NA12878 se analizaron por duplicado. Las muestras duplicadas arrojaron resultados idénticos.



9442

Lic. Alejandro Pérez
 Apóstolo
 Biosystems S.A.

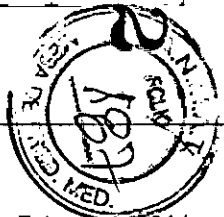
Estudio 2

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

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

Pa- nel	N.º de mues- tra	Genotipo de muestra	Variantes	Llama- das totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			N.º de llama- das incorec- tas	N.º de ausencia de llama- das	Coinciden- cia positiva (%)	Coinciden- cia negativa (%)	Coinciden- cia total (%)
					Cent- tro 1	Cent- tro 2	Cent- tro 3	Cent- tro 1	Cent- tro 2	Cent- tro 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 ¹	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 ¹	100	100	100
A	5 ²	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 ²	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Dra. Susana Zanella
 DIRECTORA TÉCNICA
 MNT 4471
 BIOSYSTEMS S.A.

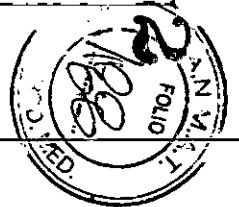


Febrero de 2014

Lic. Alejandro Díez
 Responsable
 BBSYSTEMS S.A.

Pa- nel	N.º de mue- stra	Genotipo de muestra	Variantes	Llama- das totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			N.º de llama- das incorec- tas	N.º de ausencia de llama- das	Coinciden- cia positiva (%)	Coinciden- cia negativa (%)	Coinciden- cia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	9ª	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2ª	0	97,22	99,96	99,92
A	10ª	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2ª	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	1506V, 1507V, 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

Dr. S. L. V. ZANIELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 BBSYSTEMS S.A.

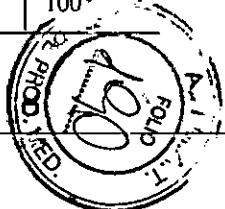


94426

Lic. Alejandro Díez
Biosystems S.A.

Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes			Llamadas coincidentes negativas (estado positivas (variantes))			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

9442

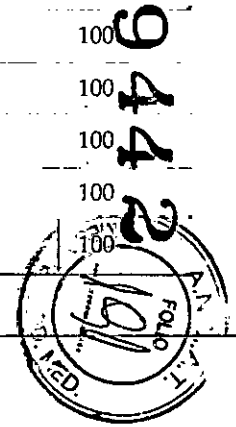


Delia Susana Zanella
Ingeniera Técnica
MNT14/A21
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez
 Abogado
 Biosystems S.A.

Pa- nel	N.º de mues- tra	Genotipo de muestra	Variantes	Llama- das totales por centro	Llamadas coincidentes			Llamadas coincidentes negativas (estado positivas (variantes))			N.º de llama- das incorec- tas	N.º de ausencia de llama- das	Coinciden- cia positiva (%)	Coinciden- cia negativa (%)	Coinciden- cia total (%)
					Cent- tro 1	Cent- tro 2	Cent- tro 3	Cent- tro 1	Cent- tro 2	Cent- tro 3					
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+10 (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+ (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del ((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		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (I)		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 (I-		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HO		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Dra. Silvia Zanella
 Directora Técnica
 Biosystems S.A.



Uc Alejandro Diez
Apodaca
Biosystems S.A.

Pa- nel	N.º de mue- stra	Genotipo de muestra	Variantes	Llama- das totales por centro	Llamadas coincidentes			Llamadas coincidentes negativas (estado positivas (variantes))			N.º de llama- das incorec- tas	N.º de ausencia de llama- das	Coinciden- cia positiva (%)	Coinciden- cia negativa (%)	Coinciden- cia total (%)
					Cent- ro 1	Cent- ro 2	Cent- ro 3	Cent- ro 1	Cent- ro 2	Cent- ro 3					
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
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

DRA. SWMINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MM 11/1421
BIOSYSTEMS S.A.

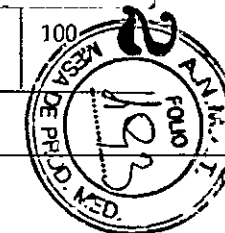


Uc Melchior Diez
Apoderado
Biosystems S.A.

Pa- nel	N.º de mue- stra	Genotipo de muestra	Variantes	Llama- das totales por centro	Llamadas coincidentes			Llamadas coincidentes negativas (estado positivas (variantes))			N.º de llama- das incorec- tas	N.º de ausencia de llama- das	Coinciden- cia positiva (%)	Coinciden- cia negativa (%)	Coinciden- cia total (%)
					Cen- tro 1	Cen- tro 2	Cen- tro 3	Cen- tro 1	Cen- tro 2	Cen- tro 3					
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 ¹	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 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
B	75 ²	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 ²	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Dra. SILVIA ZANIELA
DIRECTORA TÉCNICA
Biosystems S.A.

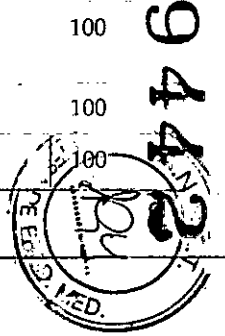
0442776



Dra. Meidunpio Díez
 Asesora de
 Biosystems S.A.

Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes			Llamadas coincidentes negativas (estado positivas (variantes))			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	78	1812-1 G>A (HE)		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 (810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del ((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 (HO		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86+	CFTR dele2, 3/F: (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1+	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1C (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/2143del (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

Dra. SILVANA JANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 BIOSYSTEMS S.A.

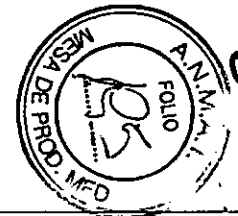


Lidia Alejandra Diez
 Aboderado
 Biosystems S.A.

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 ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Total				74 556	2209			221 182			4	273	99,77	99,88	99,88

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

Dra. SILVANA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.161
 BIOSYSTEMS S.A.



9442



9442

Extracción de ADN

Se evaluaron tres métodos de extracción distintos, extracción de bolas magnéticas, precipitación por alcohol y aislamiento de la columna de filtrado de silicio, con sangre total anticoagulada con EDTA K₂. Se utilizaron 14 muestras de sangre únicas en el estudio, lo que representaba un rango de genotipos de un gen representativo. Dos operadores diferentes comprobaron independientemente los tres métodos de extracción de ADN. Cada operador llevó a cabo tres experimentos por método de extracción. Cada operador realizó cada una de las extracciones en días diferentes. La concentración de ADN y el índice de A260/A280 de las muestras de ADN_g extraídas se determinaron mediante espectrometría. El tamaño de las muestras total para cada método de extracción de este estudio fue de 168 (14 muestras x 2 operadores/método de extracción x 3 experimentos/operador x 2 duplicados/muestra de ADN_g extraída).

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

¹Precisión: Coincidencia de porcentajes con un método de prueba de referencia (secuenciación bidireccional de Sanger) calculada para aquellas posiciones de las bases que reciben una llamada de bases.
²Índice de muestras del primer paso: Número de muestras que satisfacen el índice de llamada especificado la primera vez que se procesan (es decir, no requieren un nuevo experimento ni un procesamiento adicional). Se representa como el porcentaje del número total de muestras procesadas durante un único experimento de secuenciación de MiSeqDx.

Entrada de ADN

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

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

Sustancias interferentes

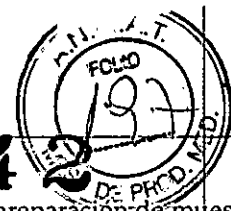
Para evaluar el impacto de las sustancias interferentes en la plataforma MiSeqDx, se utilizó un ensayo típico diseñado para buscar un solo gen en 11 529 bases en presencia y ausencia de posibles sustancias interferentes. En el estudio, se utilizaron ocho muestras de sangre total que representaban ocho genotipos únicos. Se analizaron cuatro sustancias interferentes endógenas (bilirrubina, colesterol, hemoglobina y triglicéridos) añadiéndolas a las muestras de sangre antes de la extracción de ADN. Para evaluar la interferencia resultante de la extracción de sangre (extracción breve), se añadió EDTA a las muestras de sangre en dos concentraciones. En la tabla siguiente se muestran los límites de

Febrero de 2014

Lic. Alejandro Díez
 Apodado
 BioSystems S.A.

N.º de referencia 15050260 Rev. A ESP | 52

D.ª SILVANA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



concentración de cada sustancia. Asimismo, para evaluar la interferencia resultante de la preparación de muestras, se añadió tampón de lavado al 15 % a ocho ADN genómicos purificados. Se consiguió un índice de llamada del 100 % con todas las muestras analizadas, así como una reproducibilidad del 100 % en las llamadas de genotipo entre muestras en presencia y ausencia de sustancias interferentes.

Sustancia de prueba	Número total de duplicados	Concentración comprobada en sangre (límite superior)	Concentración comprobada en sangre (límite inferior)	Índice de llamada
Bilirrubina	16	684 $\mu\text{mol/l}$	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 mg/ml	2,8 mg/ml	100 %

Índexación de muestras

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

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

Patentes y marcas registradas

Este documento y su contenido son propiedad de Illumina, Inc. y sus afiliados ("Illumina") y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes en conexión con el uso de los productos descritos en él y no para ningún otro fin. Este documento y su contenido no se utilizarán ni distribuirán con ningún otro fin ni tampoco se 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 ni similares derechos de terceros.

Para asegurar el uso correcto y seguro de los productos descritos en este documento, 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 AL PRODUCTO, LESIONES A LAS PERSONAS, INCLUIDOS LOS USUARIOS Y OTROS, Y DAÑOS A OTRA PROPIEDAD.

ILLUMINA NO ASUME RESPONSABILIDAD ALGUNA QUE SURJA DEL USO INCORRECTO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS LAS PIEZAS O EL SOFTWARE) NI DEL USO DE DICHS PRODUCTOS FUERA DEL ÁMBITO DE LAS LICENCIAS EXPRESAS ESCRITAS O LOS PERMISOS OTORGADOS POR ILLUMINA EN CONEXIÓN CON LA ADQUISICIÓN DE DICHS PRODUCTOS POR PARTE DE LOS CLIENTES.

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

© 2014 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Illumina y MiSeqDx son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de Illumina, Inc. Todas las demás marcas y nombres mencionados en el presente documento pertenecen a sus respectivos propietarios.

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

Información de contacto



Illumina
San Diego, 92122 California (EE. UU.)
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuera de Norteamérica)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



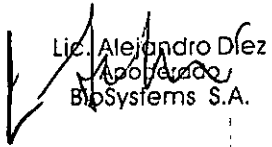
Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH La Haya
Países Bajos



Etiquetado de productos

Consulte la leyenda de los símbolos que se proporciona con cada kit para obtener información completa sobre los símbolos que pueden aparecer en el embalaje o el etiquetado de los productos.


Febrero de 2014


Lic. Alejandro Díez
Apólcado
BioSystems S.A.



N.º de referencia 15050260 Rev. A ESP | 54

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14 421
BIOSYSTEMS S.A.

Kit MiSeqDx™ Universal 1.0

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

N.º de catálogo DX-103-1001: 2 experimentos, hasta 96 muestras por kit

Uso previsto

El kit MiSeqDx Universal 1.0 de Illumina está formado por un conjunto de reactivos y consumibles que se utilizan en el procesamiento de muestras de ADN genómico humano obtenidas a partir de sangre total periférica y en la posterior secuenciación selectiva de las bibliotecas de muestras resultantes. Para la preparación de bibliotecas centradas en regiones de interés genómicas específicas, se requieren reactivos de analitos específicos proporcionados por el usuario. El kit MiSeqDx Universal 1.0 está previsto para su uso con el instrumento MiSeqDx.

Principios de procedimiento

La plataforma MiSeqDx de Illumina, que consta del kit MiSeqDx Universal 1.0 y el instrumento MiSeqDx, se ha diseñado para la secuenciación selectiva de ADN genómico humano de muestras de sangre humana total periférica. Con los reactivos proporcionados en el kit MiSeqDx Universal 1.0, el ADN genómico se procesa mediante el procedimiento de preparación de bibliotecas, y se amplifican específicamente las regiones genómicas previstas de cada muestra con los oligonucleótidos personalizados diseñados por el usuario, a la vez que también se añaden las secuencias de captura de la celda de flujo y los índices a los productos amplificados. Las bibliotecas de muestras resultantes están listas para la secuenciación en el instrumento MiSeqDx de Illumina.

La utilización del kit MiSeqDx Universal 1.0 de Illumina conlleva tres procedimientos principales para los que se proporcionan todos los reactivos, a excepción de los oligonucleótidos personalizados. El primer procedimiento consiste en la preparación de bibliotecas, que implica la preparación manual de las muestras para la secuenciación. La preparación de bibliotecas consta de cuatro pasos clave: la hibridación, la extensión-ligadura, la amplificación PCR y la normalización de bibliotecas. El segundo procedimiento consiste en secuenciar la muestra preparada mediante el uso de la química de SBS (secuenciación por síntesis) en MiSeqDx. El tercer procedimiento utiliza el software de análisis para analizar los resultados de la secuenciación y generar archivos en formato VCF (formato de llamadas de variantes) que contienen llamadas de variantes de cada muestra. La información necesaria para configurar y analizar un experimento de secuenciación, incluida una lista de muestras y sus secuencias de índice, se detalla en un archivo de hoja de muestras con formato de valores separados por comas (*.csv).

Preparación de bibliotecas

- **Hibridación:** Hibridiza un grupo de oligonucleótidos ascendentes y descendentes específicos de las regiones de interés del ADN genómico de la muestra. 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.
- **Extensión-ligadura:** Conecta los oligonucleótidos ascendentes y descendentes hibridados. Una ADN polimerasa 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 ADN ligasa. El resultado es la formación de productos que contienen los oligonucleótidos específicos de las regiones de interés flanqueados por las secuencias necesarias para la amplificación.
- **Amplificación PCR:** Amplifica los productos de extensión-ligadura con cebadores que añaden secuencias de índice para el multiplexado de muestras, así como secuencias de captura de celdas de flujo necesarias para la

Febrero de 2014

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º de referencia: 5039608 Rev. A ESP | 1

Dra. SILVANA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
BIO SYSTEMS S.A.

9442304

generación de grupos en MiSeqDx. Al final de este proceso, un procedimiento de limpieza de PCR purifica los productos de PCR (denominado biblioteca).

- **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 minimiza la tendencia a la incorporación. Las llamadas de bases se realizan directamente a partir de las mediciones de intensidad de la señal durante cada ciclo de secuenciación. El resultado final es la secuenciación base por base.

Análisis

El software de análisis en tiempo real (RTA) es el software de análisis principal integrado que realiza análisis de imágenes y llamadas de bases. Asimismo, asigna una puntuación de calidad a cada base de cada ciclo de secuenciación. Cuando finaliza el análisis principal, el software de MiSeq Reporter del instrumento MiSeqDx inicia el análisis secundario. MiSeq Reporter procesa las llamadas de bases generadas durante el análisis principal y genera información sobre cada muestra en función de la información especificada en la hoja de muestras. El análisis secundario incluye la demultiplexación, la generación del archivo FASTQ, la alineación, las llamadas de variantes y la generación de archivos VCF que contienen información sobre las variantes que se encuentran en posiciones específicas en un genoma de referencia.

Limitaciones del procedimiento

- 1 Para uso diagnóstico *in vitro*.
- 2 Este producto ofrece lo siguiente:
 - Rendimiento de secuenciación: >1 Gb
 - Lecturas: >3 millones
 - Longitud de lectura (en experimento "paired-end"): 2 x 150 bp
 - Bases por encima de Q30: >75 % (más de un 75 % de las bases tiene una puntuación de calidad según la escala de Phred superior a 30, lo que implica una precisión de llamada de bases superior al 99,9 %)
- 3 Se ha validado el sistema para la detección de variantes de nucleótido único y deleciones de hasta tres bases. La evaluación de inserciones de una base se ha limitado a tres inserciones diferentes en tres cromosomas independientes.
- 4 El sistema presenta problemas a la hora de detectar deleciones o inserciones de una base en trectos homopoliméricos como, por ejemplo, poliA.
- 5 El sistema MiSeqDx se ha diseñado para ofrecer resultados cualitativos (es decir, genotipo).
- 6 Al igual que con cualquier flujo de trabajo basado en hibridación, los polimorfismos o las mutaciones subyacentes en regiones de oligonucleótidos unidos pueden afectar a los alelos que se estén comprobando y, en consecuencia, a las llamadas realizadas.
- 7 La cobertura mínima recomendada por amplicón necesaria para la llamada de variantes precisa ($Q(\max_gt | \text{poly_site}) \geq 100$) es de 75x.



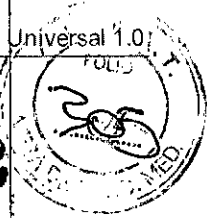
2 | N.º de referencia 15039608 Rev. A ESP

Lic. Alejandro Diez
Aprobado
BioSystems S.A.



Febrero de 2014

Dr. SILVINA ZANELLA
D.º de Lic. en Bioinformática
14 231
BIOSYSTEMS S.A.



Componentes del producto

El kit MiSeqDx Universal 1.0 de Illumina consta de lo siguiente:

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

Reactivos

Reactivos suministrados

El kit MiSeqDx Universal 1.0 de Illumina se ha configurado para dos experimentos con un máximo de 48 muestras por experimento (hasta un total de 96 muestras). Consulte las siguientes tablas para ver una lista completa de los reactivos suministrados en este kit.

Kit MiSeqDx Universal 1.0, caja 1

Tabla 1 Reactivos de preamplificación de la caja 1A

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Tampón de hibridación	1 tubo	4,32 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales y formamida	Entre -25 °C y -15 °C
Mezcla de extensión-ligadura	1 tubo	4,8 ml	Solución acuosa tamponada que contiene una mezcla patentada de ADN polimerasas, ADN ligasa y dNTP	Entre -25 °C y -15 °C
Cebadores de índice A (A501) - H (A508)	1 tubo por cebador	192 µl	Cebadores de PCR con secuencias de índice y adaptadores de secuenciación	Entre -25 °C y -15 °C
Cebadores de índice 1 (A701) - 12 (A712)	1 tubo por cebador	128 µl	Cebadores de PCR con secuencias de índice y adaptadores de secuenciación	Entre -25 °C y -15 °C
Polimerasa de PCR	1 tubo	56 µl	ADN polimerasa patentada	Entre -25 °C y -15 °C
Mezcla maestra de PCR	1 tubo	2,8 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales y dNTP	Entre -25 °C y -15 °C

Tabla 2 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 °C y -15 °C
Tampón de dilución de biblioteca	1 tubo	4,5 ml	Solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Control interno PhiX	1 tubo	10 µl	Solución acuosa tamponada que contiene ADN genómico PhiX	Entre -25 °C y -15 °C

Kit MiSeqDx Universal 1.0, caja 2

Tabla 3 Reactivos de posamplificación de la caja 2

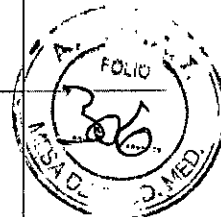
Componente	Cantidad	Contenido	Almacenamiento
Cartucho de reactivo de MiSeqDx	2 cartuchos	Cartucho de un solo uso que contiene reactivos para la generación y secuenciación de grupos para su uso con MiSeqDx, incluidos formamida, 2-mercaptoetanol y DMSO <2 %	Entre -25 °C y -15 °C

Febrero de 2014

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15039608 Rev. A ESP | 3

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



Kit MiSeqDx Universal 1.0, caja 3

9442

Tabla 4 Reactivos de preamplificación de la caja 3A

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

Tabla 5 Reactivos de posamplificación de la caja 3B

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Bolas de limpieza de PCR	1 tubo	5 ml	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 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales, 2-mercaptoetanol y formamida	Entre 2 °C y 8 °C
Bolas de biblioteca	1 tubo	1,2 ml	Solución acuosa tamponada que contiene bolas paramagnéticas de fase sólida	Entre 2 °C y 8 °C
Celda de flujo MiSeqDx	2 contenedores	1 celda de flujo	Sustrato de cristal con oligonucleótidos ligados de manera covalente	Entre 2 °C y 8 °C

Kit MiSeqDx Universal 1.0, caja 4

Tabla 6 Reactivos de posamplificación de la caja 4

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Solución SBS de MiSeqDx (PR2)	2 botellas	353,1 ml	Solución acuosa tamponada	Entre 2 °C y 8 °C

Kit MiSeqDx Universal 1.0, caja 5


Tabla 7 Reactivos de preamplificación de la caja 5

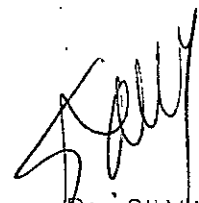
Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Placa del filtro	2 placas	N/A	Placa de microtitulación de polipropileno con una membrana de polietersulfona modificada	Entre 15 °C y 30 °C

Tabla 8 Reactivos de posamplificación de la caja 5

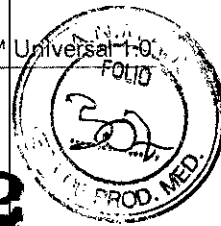
Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Tampón de elución	1 tubo	4,8 ml	Solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de almacenamiento de biblioteca	1 tubo	3,5 ml	Solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C

4 | N.º de referencia 15039608 Rev. A ESP


 Alejandro Diez
 Apoderado
 BioSystems S.A.


 Dra. SILVANA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

Febrero de 2014



Reactivos necesarios no suministrados

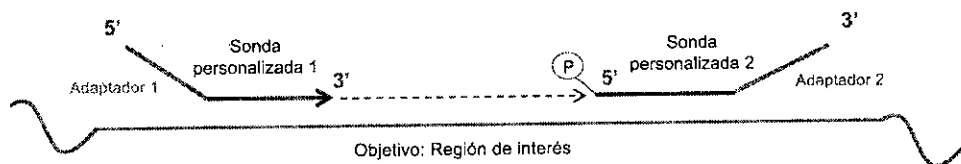
9442

Grupo de oligonucleótidos personalizados

Los oligonucleótidos del cebador específicos los debe desarrollar el usuario y no se incluyen en el kit de preparación de bibliotecas. La Figura 1 ilustra el principio de diseño de los oligonucleótidos personalizados. El diseño de los oligonucleótidos debe satisfacer los siguientes requisitos:

- Se debe diseñar un par de oligonucleótidos personalizados para cada amplicón: una sonda personalizada 1 (oligonucleótido específico de cada locus en secuencia arriba [ULSO]) y una sonda personalizada 2 (oligonucleótido específico de cada locus en secuencia abajo [DLSO]).
- Los oligonucleótidos personalizados deben rodear la región de interés. La región de interés puede ser de entre 150 y 250 bp para permitir la secuenciación completa del fragmento con el kit 2 x 150.
- Ambos oligonucleótidos deben hibridarse en la misma cadena de ADN.
- Los oligonucleótidos personalizados deben contener adaptadores específicos de Illumina para posibilitar la adición de índices y la secuenciación de adaptadores mediante PCR.
 - El adaptador 1 (5'- CAACGATCGTCGAAATTCGC-3') debe estar ubicado en el extremo 5' de la sonda personalizada 1 (ULSO).
 - El adaptador 2 (5'- AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA-3') debe estar ubicado en el extremo 3' de la sonda personalizada 2 (DLSO).
- La sonda personalizada 2 (DLSO) está fosforilada en el extremo 5' para admitir el paso de ligadura tras la extensión de la sonda personalizada 1 (ULSO).

Figura 1 Diseño de oligonucleótidos para el kit MiSeqDx Universal 1.0



- Se recomiendan los siguientes parámetros de diseño de los oligonucleótidos:
 - Rango de longitud de la sonda entre 22 y 30 nucleótidos (región específica según el gen).
 - Tamaño total del amplicón entre 190 y 290 pares de bases, incluidos los adaptadores.
 - El contenido de GC del cebador recomendado puede oscilar entre el 25 % y el 70 %.
 - Rango de temperatura recomendado entre 55 °C y 70 °C.
 - La concentración del cebador debe ser de 15 nM por oligonucleótido en el grupo personalizado.
 - No se requiere purificación de oligonucleótidos adicional tras la síntesis. Se recomienda la desalación.
 - Los oligonucleótidos se pueden diluir en tampón TE.
 - El número de amplicones por muestra puede oscilar entre 16 y 384.
 - Si se requieren placas para cubrir toda una región de interés, cada conjunto de sondas debe dirigirse a una región con un solapamiento de entre 1 y 3 bp respecto de una región objetivo adyacente. Los conjuntos de sondas adyacentes se deben diseñar con el fin de alternar cadenas para evitar interferencias.
 - La cobertura mínima recomendada por amplicón necesario para la llamada de variantes es de 75x.

El número de muestras por experimento se debe calcular en función de la cobertura mínima recomendada y dependerá de la uniformidad de la cobertura del grupo de oligonucleótidos personalizados.

Se debe crear un archivo de manifiesto para cada grupo de oligonucleótidos personalizados. El manifiesto es un archivo de texto que contiene información sobre las regiones genómicas objetivo y es necesario para que MiSeq Reporter pueda llevar a cabo el análisis. Visite el sitio web de Illumina para descargar una plantilla del archivo de manifiesto.

Febrero de 2014

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15039608 Rev. A ESP | 5

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



9442

Reactivos de preamplificación

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

Reactivos de posamplificación

- NaOH 10 N (preparación a partir de comprimidos o uso de una solución estándar)
- Etanol, 200 proof, para biología molecular
- Tampón TE
- Agua sin ARNasa, sin ADNasa

Almacenamiento y manipulación

- 1 La temperatura ambiente se define como la temperatura que oscila entre 15 °C y 30 °C.
- 2 Los siguientes reactivos se suministran congelados y permanecen estables cuando se almacenan a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C hasta la fecha de caducidad especificada.
 - Tampón de hibridación
 - Mezcla de extensión-ligadura
 - Cebadores de índice A (A501) - H (A508)
 - Cebadores de índice 1 (A701) - 12 (A712)
 - Polimerasa de PCR
 - Mezcla maestra de PCR
 - Diluyente de normalización de bibliotecas
 - Tampón de dilución de biblioteca
 - Control interno PhiX
 - Cartucho de reactivo de MiSeqDx

Salvo en el caso del cartucho de reactivo, los reactivos permanecen estables durante un máximo de seis ciclos de congelación y descongelación llevados a cabo en una fecha anterior a la fecha de caducidad especificada. No vuelva a congelar el cartucho de reactivo una vez descongelado. Se puede almacenar hasta seis horas a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.

- 3 Los siguientes reactivos 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.
 - Tampón de lavado restrictivo
 - Tampón de lavado universal
 - Bolas de limpieza de PCR
 - Bolas de biblioteca
 - Lavado de normalización de bibliotecas
 - Solución SBS de MiSeqDx (PR2)
 - Celda de flujo MiSeqDx
- 4 Los siguientes reactivos se suministran a temperatura ambiente y permanecen estables cuando se almacenan a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad especificada.
 - Tampón de elución
 - Placa del filtro
 - Tampón de almacenamiento de biblioteca
- 5 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.



- 6 Los reactivos tampón de hibridación, tampón de lavado restrictivo y diluyente de normalización de bibliotecas pueden formar precipitados o cristales visibles. Antes de su uso, agite con fuerza y, a continuación, inspeccione visualmente para garantizar que no haya precipitados.
- 7 Siga estas prácticas recomendadas para la manipulación de las bolas de limpieza de PCR y las bolas de biblioteca:
 - No se deben congelar las bolas en ningún caso.
 - Deje que las bolas alcancen la temperatura ambiente.
 - Justo antes de su uso, agite las bolas hasta que queden bien suspendidas y el color muestre un aspecto homogéneo.
 - Mezcle bien la muestra después de añadir las bolas pipeteando arriba y abajo 10 veces. Se puede utilizar un mezclador para mezclar las muestras de forma homogénea.
 - 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 se aclare. Mantenga la placa en el soporte magnético mientras aspira lentamente el sobrenadante y evite alterar las bolas apartadas.
- 8 La placa de amplificación PCR puede permanecer en el ciclador térmico durante toda la noche. También se puede almacenar a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C hasta dos días. Antes de almacenar la placa a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C, selle el pocillo de la placa.
- 9 No congele las bolas de biblioteca ni las mezcle con el reactivo diluyente de normalización de bibliotecas si no se van a utilizar de manera inmediata.
- 10 La placa de normalización de bibliotecas completa se puede almacenar a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C hasta tres días.
- 11 La biblioteca de amplicones agrupados se puede almacenar a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C hasta tres días.
- 12 Cargue inmediatamente el grupo de amplicón diluido recién preparado en el cartucho de reactivo. El almacenamiento del grupo de amplicón diluido puede reducir considerablemente la densidad de grupos.

Materiales y equipo

Materiales y equipo suministrados vendidos por separado

- 1 Instrumento MiSeqDx, n.º de catálogo DX-410-1001
- 2 Kit TruSeq Index Plate Fixture, n.º de catálogo FC-130-1005
- 3 Kit TruSeq Index Plate Fixture & Collar, n.º de catálogo FC-130-1007
- 4 Tapones de recambio para el adaptador de índices, n.º de catálogo DX-502-1003

Materiales y equipo necesarios no suministrados

Materiales y equipo de la preamplificación

- 1 **Bloque de calor:** Se precisa un bloque de calor para una placa de 96 pocillos. El bloque de calor debe cumplir con las especificaciones de rendimiento siguientes. Los bloques de calor con tapas calientes se pueden utilizar.
 - Rango de temperatura: Ambiente de +5 °C a 99 °C
 - Regulación de temperatura: ± 0,1 °C a 37 °C; ± 0,4 °C a 60 °C
- 2 **Incubadora de muestras:** Se precisa una incubadora (horno de hibridación). La incubadora debe cumplir con las especificaciones de rendimiento siguientes:
 - Rango de temperatura: Entre 10 °C y 100 °C
 - Regulación de temperatura: ± 0,2 °C

Febrero de 2014

Lic. Alejandro Díez
Apostrado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15039608 Rev. A ESP | 7

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



- 3 **Centrífuga de sobremesa:** Se precisa una centrífuga de sobremesa que pueda mantener 20 °C. (Se precisa una centrífuga independiente en el área de posamplificación). Se admite cualquier centrífuga de placas que alcance las velocidades indicadas en el protocolo (de 280 a 2400 x g).
- 4 **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 en el 5 % de volumen indicado.
- 5 **Consumibles:** Se precisan los consumibles siguientes.
 - Placas de PCR con faldones de 96 pocillos, 0,2 ml, polipropileno o equivalente
 - NOTA: Asegúrese de que la placa de 96 pocillos sea compatible con el soporte magnético.
 - Placas de almacenamiento de 96 pocillos, 0,8 ml (placas MIDI)
 - Recipiente de solución, PVC, sin ADNasa/ARNasa (cubeta)
 - Sello de película de aluminio adhesiva
 - Sello para placas de PCR adecuado
 - Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles

Materiales y equipo de la posamplificación

- 1 **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: Entre 4 °C y 99 °C
 - Precisión de control: ± 0,25 °C de 35 °C a 99 °C
- 2 **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 rpm
 - Rango de velocidad de mezcla: De 200 a 3000 rpm
- 3 **Centrífuga de sobremesa:** Se precisa una centrífuga de sobremesa que pueda mantener 20 °C. (Se precisa una centrífuga independiente en el área de preamplificación). Se admite cualquier centrífuga de placas que alcance las velocidades indicadas en el protocolo (de 280 a 2400 x g).
- 4 **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: Ambiente de +5 °C a 99 °C
 - Regulación de temperatura: ± 0,1 °C a 37 °C; ± 0,4 °C a 60 °C
- 5 **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.
- 6 **Pipetas de precisión:** Se precisa un conjunto de pipetas de precisión. (Se precisa 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 en el 5 % de volumen indicado.
- 7 **Consumibles:** Se precisan los consumibles siguientes.
 - Placas de PCR con faldones de 96 pocillos, 0,2 ml, polipropileno o equivalente
 - NOTA: Asegúrese de que la placa de 96 pocillos sea compatible con el soporte magnético.
 - Placas de almacenamiento de 96 pocillos, 0,8 ml (placas MIDI)
 - Tubos cónicos, 15 ml
 - Tubos de microcentrífuga Eppendorf (recomendados con cierre de rosca)
 - Gradillas de ocho tubos de PCR
 - Recipiente de solución, PVC, sin ADNasa/ARNasa (cubeta)
 - Sello de película de aluminio adhesiva
 - Sello adhesivo para placas
 - Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles



9442

Recopilación, transporte y almacenamiento de muestras



NOTA

Manipule todas las muestras como si fueran agentes potencialmente infecciosos.

- 1 Se pueden utilizar muestras de sangre total recogidas en tubos EDTA K₂.
- 2 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.
- 3 Es posible transportar sangre total durante un máximo de siete días a temperatura ambiente, 30 días a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C o 30 días congelada 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.
- 4 No se observaron efectos adversos en el rendimiento del kit al someter el ADN genómico a seis ciclos de congelación y descongelación.
- 5 No se observaron efectos adversos en el rendimiento del kit con muestras de sangre total con presencia elevada de bilirrubina, colesterol, hemoglobina, triglicéridos o EDTA.

Advertencias y precauciones



PRECAUCIÓN

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

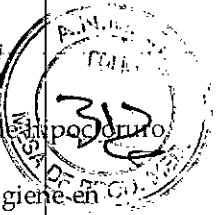
- 1 Algunos componentes de este kit contienen formamida, una amida alifática que es una toxina reproductiva probable. (Consulte *Reactivos* en la página 3 para obtener más información). Evite su inhalación o ingestión, o el contacto con la piel o los ojos, pues podrían producirse lesiones. Deseche los contenedores y los contenidos utilizados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona. Para obtener más información, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
- 2 Algunos componentes de este kit contienen 2-mercaptoetanol, un agente reductor. (Consulte *Reactivos* en la página 3 para obtener más información). Evite su inhalación o ingestión, o el contacto con la piel o los ojos, pues podrían producirse 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, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
- 3 Manipule todas las muestras como si fueran agentes potencialmente infecciosos.
- 4 El incumplimiento de los procedimientos descritos puede provocar resultados erróneos o una reducción considerable de la calidad de las muestras.
- 5 Tenga en cuenta las precauciones habituales 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 los reactivos del kit. Lávese bien las manos tras la manipulación de muestras y reactivos del kit.
- 6 No utilice los componentes del kit una vez alcanzada la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja del kit. No intercambie los componentes del kit de lotes de kit distintos. Tenga en cuenta que los lotes de kit se identifican con la etiqueta de la caja del kit.
- 7 Almacene los componentes del kit a la temperatura especificada en las áreas de preamplificación y posamplificación designadas.
- 8 Los ciclos de congelación y descongelación repetidos (hasta seis) de los componentes de la caja 1 no afectarán a la integridad del kit.

Febrero de 2014

Lic. Alejandro Díez
Boccardo
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15039608 Rev. A ESP | 9

Dra. SILVANA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



- 9 Para evitar la degradación de las muestras o los reactivos, asegúrese de que todos los vapores de hipoclorito sódico se hayan disipado completamente antes de iniciar el protocolo.
- 10 Se precisa seguir 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 arrojar resultados poco precisos y fiables.
- 11 Para evitar la contaminación, asegúrese de que las áreas de preamplificación y posamplificación dispongan de equipos especializados (tales como pipetas, puntas de pipetas, mezcladores vorticiales y centrifugas).
- 12 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 de restos de amplicones y de contaminación cruzada entre muestras.
- 13 El emparejamiento de muestras de índice debe coincidir exactamente con la hoja de muestras. Las incoherencias entre la hoja de muestras y la disposición de placas provocará la pérdida de identificación de muestras positivas y la generación de informes con resultados incorrectos.
- 14 Para el procedimiento de lavado, prepare siempre una solución nueva con etanol al 80 %. El etanol puede absorber agua del aire y afectar a los resultados.
- 15 Asegúrese siempre de eliminar el etanol del fondo de los pocillos durante el procedimiento de lavado. Los restos de etanol pueden afectar a los resultados.
- 16 Cumpla el tiempo de secado especificado siguiendo el paso relativo al soporte magnético para garantizar una evaporación completa. Los restos de etanol pueden afectar al rendimiento de las reacciones posteriores.
- 17 No mezcle el grupo de oligonucleótidos personalizados y el tampón de hibridación para el almacenamiento. Al combinarse, el grupo de oligonucleótidos personalizados se vuelve inestable incluso si se almacena congelado.
- 18 No se recomienda 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.
- 19 Añada siempre polimerasa de PCR a la mezcla maestra de PCR justo antes de su uso. Nunca almacene la solución de trabajo combinada.
- 20 Durante el paso de normalización de bibliotecas, es muy importante resuspender por completo el pellet de las bolas de la biblioteca. Esto resulta fundamental para lograr una densidad de grupos homogénea en la celda de flujo de MiSeqDx.
- 21 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.
- 22 Debido al número de transferencias de placas y al potencial de contaminación consiguiente, se debe prestar especial atención para garantizar que el contenido de los pocillos permanezca completamente en el pocillo. Evite las salpicaduras de contenido.
- 23 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 kit.

Notas de procedimiento

- 1 Ilumina 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 variante conocida en la región de interés.
- 2 Antes de iniciar el protocolo del kit MiSeqDx Universal 1.0, extraiga y cuantifique el ADN.
- 3 Se puede utilizar cualquier método de extracción de ADN validado.
- 4 Cuantifique el ADN con un espectrómetro. Verifique que A260/A280 de la muestra de ADN sea superior a 1,5. Normalice la muestra de ADN a 50 ng/μl. Cada muestra requiere 5 μl de ADN genómico (total de 250 ng).



9442

Producción de muestras y representación de índices

Para el kit MiSeqDx Universal 1.0 de Illumina, la producción de muestras por experimento MiSeqDx es de entre 8 y 48 muestras. Los cebadores de índice utilizados durante la amplificación PCR se deben elegir en función de la producción final de muestras deseada con el fin de garantizar la diversidad de la secuencia de índice.



NOTA

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

MiSeqDx utiliza un LED verde para secuenciar bases G/T y un LED rojo para secuenciar bases A/C. En cada ciclo, se debe leer como mínimo uno de los dos nucleótidos de cada canal de color para garantizar un registro adecuado. Es importante mantener el equilibrio de colores de cada base de la lectura de índice que es objeto de secuenciación puesto que, de lo contrario, se podría producir un fallo de registro durante la secuenciación de la lectura del índice. Consulte la Tabla 9 para elegir las combinaciones de cebadores de índice para experimentos de 48 o 96 muestras.

Tabla 9 Combinaciones de cebadores de índice para experimentos de secuenciación de 48 muestras o 96 muestras

Filas de la A a la H	Columnas de la 1 a la 6	Columnas de la 7 a la 12
Cebador de índice A (A501)	Cebador de índice 1 (A701)	Cebador de índice 6 (A706)
Cebador de índice B (A502)	Cebador de índice 2 (A702)	Cebador de índice 7 (A707)
Cebador de índice C (A503)	Cebador de índice 3 (A703)	Cebador de índice 8 (A708)
Cebador de índice D (A504)	Cebador de índice 4 (A704)	Cebador de índice 9 (A709)
Cebador de índice E (A505)	Cebador de índice 5 (A705)	Cebador de índice 11 (A711)
Cebador de índice F (A506)	Cebador de índice 10 (A710)	Cebador de índice 12 (A712)
Cebador de índice G (A507)	--	--
Cebador de índice H (A508)	--	--

Si la secuenciación es inferior a 48 muestras en un experimento de secuenciación, seleccione los índices apropiados de acuerdo con sus secuencias para mantener el equilibrio de color en los canales verde y rojo. Consulte la Tabla 11 y la Tabla 12. Como mínimo, los experimentos que emplean entre 8 y 48 muestras deben incluir las combinaciones de cebadores de índice que se muestran en la Tabla 10.

Para procesar con precisión experimentos más pequeños, como mínimo se debe disponer de ocho muestras. Si no se dispone de seis muestras únicas (excluidos los controles positivos y negativos), se puede llenar el experimento con duplicados de muestras o de cualquier muestra de ADN genómico humano. Consulte la Tabla 10 para obtener información sobre el conjunto mínimo de índices con equilibrio de color que utilizar para los experimentos de secuenciación de ocho muestras.

Tabla 10 Combinaciones de cebadores de índice para experimentos de secuenciación de ocho muestras

	Cebador de índice 1 (A701)	Cebador de índice 2 (A702)	Cebador de índice 10 (A710)
Cebador de índice C (A503)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Cebador de índice D (A504)	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
Cebador de índice E (A505)	Muestra 7	Muestra 8	--

Febrero de 2014

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15039608 Rev. A ESP | 11

Dra. SILVANA ARELLANO
DIRECTORA TÉCNICA
MN 4.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Secuencias del cebador de índice

Tabla 11 Secuencias para Cebadores de índice A (A501) - H (A508)

Cebador de índice	Secuencia
Cebador de índice A (A501)	TGAACCTT
Cebador de índice B (A502)	TGCTAAGT
Cebador de índice C (A503)	TGTTCTCT
Cebador de índice D (A504)	TAAGACAC
Cebador de índice E (A505)	CTAATCGA
Cebador de índice F (A506)	CTAGAACA
Cebador de índice G (A507)	TAAGTTCC
Cebador de índice H (A508)	TAGACCTA

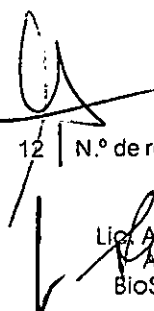
Tabla 12 Secuencias para Cebadores de índice 1 (A701) - 12 (A712)

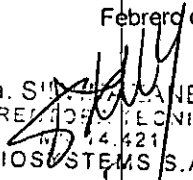
Cebador de índice	Secuencia
Cebador de índice 1 (A701)	ATCACGAC
Cebador de índice 2 (A702)	ACAGTGGT
Cebador de índice 3 (A703)	CAGATCCA
Cebador de índice 4 (A704)	ACAAACGG
Cebador de índice 5 (A705)	ACCCAGCA
Cebador de índice 6 (A706)	AACCCCTC
Cebador de índice 7 (A707)	CCCAACCT
Cebador de índice 8 (A708)	CACCACAC
Cebador de índice 9 (A709)	GAAACCCA
Cebador de índice 10 (A710)	TGTGACCA
Cebador de índice 11 (A711)	AGGGTCAA
Cebador de índice 12 (A712)	AGGAGTGG

Instrucciones de uso

Preparación de la hoja de muestras de MiSeqDx

- 1 En la pantalla Welcome (Bienvenida) de Gestor de la lista de trabajos de Illumina, seleccione **Create Worklist** (Crear lista de trabajo).
- 2 En el campo Test Type (Tipo de prueba), seleccione **MiSeqDx Universal**.


 Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 BioSystems S.A.


 Dra. Silvia Zanella
 DIRECTORA TÉCNICA
 N.º 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



- 3 En el campo Worklist Name (Nombre de la lista de trabajo), introduzca un nombre para la hoja de muestras.
 - Si se usa el ID alfanumérico del código de barras del cartucho de reactivo para el nombre de la hoja de muestras, software operativo de MiSeq (MOS) encontrará la hoja de muestras automáticamente.
 - Si se asigna otro nombre a la hoja de muestras, se puede usar el botón **Browse** (Examinar) de software operativo de MiSeq (MOS) para localizar la hoja de muestras correspondiente.
- 4 [Opcional] Escriba una descripción para identificar el experimento.
- 5 Asegúrese de que la fecha coincida con la fecha de inicio del experimento.
- 6 Seleccione **Next** (Siguiente).

Introducción de información de la muestra

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

Hibridación de grupo de oligonucleótidos

Preparación

- 1 Deje que el grupo de oligonucleótidos personalizados, el tampón de hibridación, las muestras de ADN genómico y la muestra de control positivo alcancen la temperatura ambiente.
- 2 Agite el grupo de oligonucleótidos personalizados y el tampón de hibridación con fuerza para asegurarse de que todos los precipitados se hayan disuelto por completo y, a continuación, centrifugue brevemente los tubos para recoger el líquido.
- 3 Caliente un bloque de calor de 96 pocillos a 95 °C.
- 4 Precaliente una incubadora a 37 °C.
- 5 Cree la placa de muestras de acuerdo con el gráfico de placa impreso con el IWM.

Procedimiento

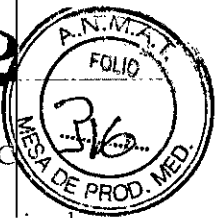
- 1 Disponga una nueva placa de PCR de 96 pocillos (en adelante, placa **HYB**).
- 2 Añada 5 µl de muestra o control a 50 ng/µl (250 ng total) en los pocillos correspondientes de la placa **HYB**. Siga la disposición de placas generada para una selección correcta de los pocillos.
- 3 Añada 5 µl de grupo de oligonucleótidos personalizados en todos en todos los pocillos que contienen ADN genómico.
- 4 Añada 40 µl de Tampón de hibridación en cada muestra de la placa **HYB**. Pipetee con cuidado arriba y abajo entre tres y cinco veces para mezclar.
- 5 Selle la placa **HYB** y centrifugue a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- 6 Coloque la placa **HYB** en el bloque precalentado a 95 °C e incúbela durante un minuto.

Febrero de 2014

Dr. Alejandro Díez
Boccardo
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15039608 Rev. A ESP | 13

Dr. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



- 7 Reduzca la temperatura del bloque de calor a 40 °C y sígalo incubando hasta que alcance los 40 °C (aproximadamente, unos 80 minutos).

Para una hibridación adecuada es fundamental una refrigeración gradual; por lo tanto, no se recomiendan los cicladores térmicos para PCR con refrigeración activa (por ejemplo, efecto Peltier, refrigeración termoeléctrica) para este proceso.



PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

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

Eliminación de oligonucleótidos sin ligar

Preparación

- Deje que la mezcla de extensión-ligadura, el tampón de lavado restrictivo y el tampón de lavado universal alcancen la temperatura ambiente y, a continuación, agite brevemente.
- Monte el conjunto de la unidad de la placa del filtro (en adelante, **FPU**) desde la parte superior hasta la parte inferior: tapa, placa del filtro, collar adaptador y placa MIDI.
- Realice un lavado previo a la membrana de la placa del filtro como se indica a continuación:
 - Añada 45 µl de tampón de lavado restrictivo en cada pocillo.
 - Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a 2400 × g a 20 °C durante cinco minutos.

Procedimiento

- Retire la placa **HYB** del bloque de calor y centrifugue a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- Transfiera el volumen íntegro (aproximadamente 55 µl) de cada muestra a los pocillos correspondientes de la placa del filtro.
- Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a 2400 × g a 20 °C durante cinco minutos.
- Lave la placa del filtro como se indica a continuación:
 - Añada 45 µl de tampón de lavado restrictivo en cada pocillo de muestra.
 - Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a 2400 × g a 20 °C durante cinco minutos.
- Repita el lavado tal y como se describe en el paso anterior.



NOTA

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 (unos cinco o diez minutos adicionales).

- Deseche todo el flujo (que contiene formamida) recogido hasta este punto y, a continuación, vuelva a montar la **FPU**.
- Añada 45 µl de tampón de lavado universal en cada pocillo de muestra.
- Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a 2400 × g a 20 °C durante 10 minutos.



NOTA

Asegúrese de que se haya drenado todo el líquido tras el centrifugado. Repita el centrifugado en caso necesario.

Extensión-ligadura de oligonucleótidos ligados

Procedimiento

- Añada 45 µl de mezcla de extensión-ligadura en cada pocillo de muestra de la placa del filtro.
- Selle la placa del filtro con película de aluminio adhesiva y, a continuación, cúbrala con la tapa.
- Incube la **FPU** en la incubadora precalentada a 37 °C durante 45 minutos.



9442

Amplificación PCR

Preparación

- 1 Prepare NaOH 0,05 N nuevo.
- 2 Determine los cebadores de índice que se deben utilizar de acuerdo con la impresión del gráfico de la placa de Gestor de la lista de trabajos de Illumina.
- 3 Deje que la mezcla maestra de PCR y los cebadores de índice adecuados alcancen la temperatura ambiente. Agite cada tubo congelado para mezclarlo y, a continuación, centrifugue brevemente los tubos.
- 4 Disponga una nueva placa de PCR de 96 pocillos (en adelante, placa AMP).
- 5 Añada cebadores de índice a la placa AMP como se indica a continuación:
 - a Añada 4 µl de cebadores de índice seleccionados [A (A501) - H (A508)] al pocillo correspondiente en una columna de la placa AMP.
 - b Deseche los tapones blancos originales y coloque tapones blancos nuevos.
 - c Añada 4 µl de cebadores de índice seleccionados [1 (A701) - 12 (A712)] a la fila correspondiente de la placa AMP. *Se deben cambiar las puntas después de cada fila para evitar la contaminación cruzada entre índices.*
 - d Deseche los tapones naranjas originales y coloque tapones naranjas nuevos.
- 6 Prepare la solución de trabajo de PCR de mezcla maestra de PCR/polimerasa de PCR tal y como se indica a continuación:
 - a Para 96 muestras, añada 56 µl de polimerasa de PCR a 2,8 ml de mezcla maestra de PCR.
 - b Invierta la solución de trabajo de PCR preparada 20 veces para mezclarla.
 La solución de trabajo de PCR permanece estable a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Procedimiento

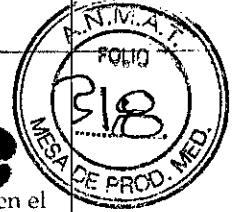
- 1 Retire la FPU de la incubadora y, a continuación, retire el sello de película de aluminio.
- 2 Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a 2400 × g a 20 °C durante dos minutos.
- 3 Añada 25 µl de NaOH 0,05 N en cada pocillo de muestra en la placa del filtro. Pipetee NaOH arriba y abajo cinco o seis veces.
- 4 Cubra e incube la placa del filtro a temperatura ambiente durante cinco minutos.
- 5 Mientras la placa del filtro se incuba, transfiera 22 µl de la solución de trabajo de PCR a cada pocillo de la placa AMP que contiene cebadores de índice.
- 6 Transfiera muestras eluidas desde el filtro hasta la placa AMP como se indica a continuación:
 - a Pipetee las muestras en la primera columna de la placa del filtro arriba y abajo cinco o seis veces.
 - b Transfiera 20 µl desde la placa del filtro a la columna correspondiente de la placa AMP.
 - c Pipetee con cuidado arriba y abajo cinco o seis veces para combinar bien el ADN con la solución de trabajo de PCR.
 - d Transfiera las columnas restantes desde la placa del filtro a la placa AMP de una manera similar. *Se deben cambiar las puntas después de cada columna para evitar la contaminación cruzada entre índices y muestras.*
- 7 Selle la placa AMP y asegúrela con un rodillo de goma.
- 8 Centrifugue a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- 9 Transfiera la placa AMP al área de posamplificación.
- 10 Ejecute el proceso de PCR mediante el uso del siguiente programa en un ciclador térmico:
 - 95 °C durante 3 minutos
 - 25 ciclos de:
 - 95 °C durante 30 segundos
 - 62 °C durante 30 segundos
 - 72 °C durante 60 segundos
 - 72 °C durante 5 minutos

Febrero de 2014

Lic. Alejandro Diez
 Apellido
 BioSystems S.A.

N.º de referencia 15039608 Rev. A/ESF 15

Dra. SILVINA ZAMELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 N.º 14 421
 BIOSYSTEMS S.A.



9442

— Mantenga la temperatura a 10 °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 °C a 8 °C hasta 48 horas.

Limpieza de PCR

Preparación

- 1 Deje que las bolas de limpieza de PCR alcancen la temperatura ambiente.
- 2 Prepare una solución nueva con etanol al 80 % a partir de una solución de etanol absoluta.

Procedimiento

- 1 Centrifugue la placa AMP a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- 2 Disponga una nueva placa MIDI (en adelante, placa CLP).
- 3 Invierta las bolas de limpieza de PCR 10 veces. Agite con vigor 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 la placa AMP a la placa CLP.
- 6 Selle la placa CLP y agítela en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante dos minutos.
- 7 Incube a temperatura ambiente sin agitar durante 10 minutos.
- 8 Coloque la placa en un soporte magnético durante un mínimo de dos minutos o hasta que el sobrenadante desaparezca.
- 9 Con la placa CLP en el soporte magnético, extraiga y deseche con cuidado el sobrenadante.
- 10 Con la placa CLP en el soporte magnético, lave las bolas tal y como se indica a continuación:
 - a Añada 200 µl de etanol al 80 % recién preparado en cada pocillo de muestra.
 - b Incube la placa en el soporte magnético durante un mínimo de 30 segundos o hasta que el sobrenadante desaparezca.
 - c Extraiga y deseche con cuidado el sobrenadante.
- 11 Repita el lavado tal y como se describe en el paso anterior.
- 12 Utilice una pipeta multicanal P20 con configuración de pipeteo a 20 µl para extraer el exceso de etanol.
- 13 Retire la placa CLP del soporte magnético y deje secar las bolas durante 10 minutos.
- 14 Añada 30 µl de tampón de elución en cada muestra y, a continuación, agite brevemente.
- 15 Selle la placa CLP y agítela en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante dos minutos. Tras agitar, verifique si las muestras estaban resuspendidas. En caso contrario, repita este paso.
- 16 Incube a temperatura ambiente durante dos minutos.
- 17 Coloque la placa CLP en el soporte magnético durante un mínimo de dos minutos o hasta que el sobrenadante desaparezca.
- 18 Disponga una nueva placa MIDI (en adelante, placa LNP).
- 19 Transfiera 20 µl del sobrenadante de la placa CLP a la placa LNP.
- 20 [Opcional] Transfiera los 10 µl de sobrenadante restante de la placa CLP a una nueva placa y asigne una etiqueta a la placa que incluya un nombre de experimento y la fecha. Almacene la placa a una temperatura 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.





9442

Normalización de bibliotecas

Preparación

- 1 Prepare NaOH 0,1 N nuevo.
- 2 Deje que el diluyente de normalización de bibliotecas, las bolas de biblioteca y el lavado de normalización de bibliotecas alcancen la temperatura ambiente.
- 3 Agite las bolas de biblioteca con vigor y asegúrese de que todos los precipitados se hayan disueltos por completo.
- 4 Agite las bolas de biblioteca con vigor durante un minuto invirtiéndolo de manera intermitente hasta que las bolas se resuspendan y no quede pellet en el fondo del tubo cuando este se invierte.

Procedimiento

- 1 Mezcle diluyente de normalización de bibliotecas y bolas de biblioteca en un tubo cónico nuevo de 15 ml como se indica a continuación:
 -  **NOTA**
Si se van a procesar menos de 24 muestras, utilice un tubo nuevo de 1,5 ml.
 - a Para 96 muestras, añada 4,4 ml de diluyente de normalización de bibliotecas.
 - b Pipetee bolas de biblioteca arriba y abajo 10 veces para resuspender.
 -  **NOTA**
Resulta muy importante resuspender completamente el pellet de las bolas de la biblioteca del fondo del tubo. Si utiliza una P1000, se asegurará de que las bolas queden resuspendidas de manera homogénea y de que no quede masa de bolas en el fondo del tubo. Esto resulta fundamental para lograr una densidad de grupos homogénea en la celda de flujo.
 - c Para 96 muestras, pipetee 800 µl de bolas de biblioteca en el tubo que contiene diluyente de normalización de bibliotecas.
 - d Dé la vuelta al tubo entre 15 y 20 veces para mezclar el contenido.
- 2 Añada 45 µl de la solución de trabajo diluyente de normalización de bibliotecas/bolas de biblioteca combinada en cada pocillo de la placa LNP que contiene bibliotecas.
- 3 Selle la placa LNP y agítela en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante 30 minutos.
- 4 Coloque la placa en un soporte magnético durante un mínimo de dos minutos o hasta que el sobrenadante desaparezca.
- 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 µl 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 rpm durante cinco minutos.
 - c Coloque la placa en el soporte magnético durante un mínimo de dos minutos o hasta que el sobrenadante desaparezca.
 - 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 µl para extraer el exceso de lavado de normalización de bibliotecas.
- 9 Retire la placa LNP del soporte magnético y añada 30 µl de NaOH 0,1 N en cada pocillo.
- 10 Selle la placa LNP y agítela en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante cinco minutos.
- 11 Durante los cinco minutos de elución, disponga una nueva placa de PCR de 96 pocillos (en adelante, placa SGP).
- 12 Añada 30 µl de tampón de almacenamiento de biblioteca a cada pocillo que se debe utilizar en la placa SGP.

Febrero de 2014

Jr. Alejandro Díez
Apotecado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15039603 Rev. A ESP | 17

Dra. SILVANA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 1.421
BIOSYSTEMS S.A.



- 13 Tras la elución de cinco minutos, 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 para resuspender las bolas y, a continuación, agite cinco minutos más.
- 14 Coloque la placa LNP en el soporte magnético durante un mínimo de dos minutos.
- 15 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 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante un minuto.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si no se procede de manera inmediata a la agrupación de bibliotecas y la consiguiente secuenciación en MiSeqDx, almacene la placa SGP sellada a una temperatura de entre $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ y $-15 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta tres días.

Agrupación de bibliotecas

Preparación para agrupación de bibliotecas

- 1 Caliente un bloque de calor apto para tubos de centrifuga de 1,5 ml a $96 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 2 En una hielera, prepare un baño de agua con hielo. Enfríe el tampón de dilución de biblioteca en el baño de agua con hielo.
- 3 Empiece a descongelar el cartucho de reactivo de MiSeqDx.

Preparación de una dilución nueva de NaOH

PRECAUCIÓN

El uso de una solución nueva de NaOH diluida es esencial para desnaturalizar completamente las muestras para la generación de grupos en MiSeqDx.

- 1 Combine los volúmenes siguientes en un tubo de microcentrifuga:
 - Agua sin ARNasa, ADNasa ($900 \text{ } \mu\text{l}$)
 - Preparado de NaOH 1,0 N ($100 \text{ } \mu\text{l}$)
- 2 Invierta el tubo varias veces para mezclar.

Desnaturalización y dilución de Control interno PhiX

- 1 Combine los siguientes volúmenes para diluir la biblioteca Control interno PhiX a 2 nM:
 - Biblioteca Control interno PhiX de 10 nM ($2 \text{ } \mu\text{l}$)
 - 1 tampón TE ($8 \text{ } \mu\text{l}$)
- 2 Combine los siguientes volúmenes para que dé como resultado una biblioteca Control interno PhiX de 1 nM:
 - Biblioteca Control interno PhiX de 2 nM ($10 \text{ } \mu\text{l}$)
 - NaOH 0,1 N ($10 \text{ } \mu\text{l}$)
- 3 Agite brevemente para mezclar la solución de la biblioteca Control interno PhiX de 1 nM.
- 4 Centrifugue la solución de plantilla a $280 \times g$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante un minuto.
- 5 Incúbela durante 4,5 minutos a temperatura ambiente para desnaturalizar la biblioteca Control interno PhiX en cadenas individuales.
- 6 Añada el siguiente volumen de tampón de dilución de biblioteca previamente refrigerado en el tubo que contiene la biblioteca Control interno PhiX desnaturalizada para obtener una biblioteca Control interno PhiX de 20 pM.
 - Biblioteca Control interno PhiX desnaturalizada ($20 \text{ } \mu\text{l}$)
 - Tampón de dilución de biblioteca enfriado previamente ($980 \text{ } \mu\text{l}$)

Preparación del cartucho de reactivo

- 1 Descongele el cartucho de reactivo de MiSeqDx con un baño de agua con suficiente agua desionizada a temperatura ambiente como para sumergir la base del cartucho de reactivo hasta la línea de agua impresa en



9442

- este. No permita que el agua supere la línea de agua máxima.
- Descongele el cartucho de reactivo en el baño de agua a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora o hasta que se haya descongelado por completo.
 - Saque el cartucho del baño de agua y dé unos suaves toques en la mesa para que el agua salga de la base del cartucho. Seque la base del cartucho. Asegúrese de que no haya salpicaduras de agua en la parte superior del cartucho de reactivo.

Inspección del cartucho de reactivo

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



NOTA

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

- Inspeccione visualmente el reactivo de la posición 1 para asegurarse de que se haya mezclado completamente y no presente precipitados.
- Golpee suavemente el cartucho en la mesa para reducir las burbujas de aire en los reactivos.



NOTA

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

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

Preparación de muestras para secuenciación

- Deje que el tampón de dilución de biblioteca alcance la temperatura ambiente. Agite el tampón de dilución de biblioteca y asegúrese de que todos los precipitados se hayan disuelto por completo.
- Si la placa **SGP** se ha almacenado congelada, descongele la placa **SGP** a temperatura ambiente.
- Centrifugue la placa **SGP** a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- Disponga un tubo Eppendorf nuevo (en adelante, tubo **PAL**).
- Determine las muestras que se deben agrupar para la secuenciación. Se puede agrupar un máximo de 48 muestras para su secuenciación.
- Si la placa **SGP** se ha almacenado congelada, mezcle cada biblioteca que se deba secuenciar pipeteando arriba y abajo entre tres y cinco veces.
- Transfiera 5 µl de cada biblioteca que se deba secuenciar de la placa **SGP**, columna por columna, a un portagradillas de ocho tubos de PCR. Selle la placa **SGP** con un sello adhesivo para placas y resérvela.



NOTA

Tras su uso, almacene la placa **SGP** sellada a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C. La placa **SGP** sellada permanece estable hasta tres días.

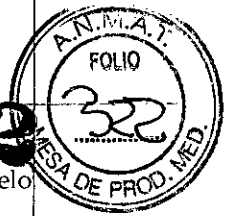
- Combine y transfiera el contenido de la gradilla de ocho tubos de PCR al tubo **PAL**. Mezcle bien el tubo **PAL**.
- Disponga un tubo Eppendorf nuevo (en adelante, tubo **DAL**).
- Añada 585 µl de tampón de dilución de biblioteca al tubo **DAL**.
- Añada 6 µl de 20 pM de control interno PhiX al tubo **DAL**. Pipetee arriba y abajo entre tres y cinco veces para enjuagar la punta y garantizar una transferencia completa.
- Transfiera 9 µl de **PAL** al tubo **DAL** que contiene Tampón de dilución de biblioteca. Pipetee arriba y abajo entre tres y cinco veces para enjuagar la punta y garantizar una transferencia completa.
- Mezcle la **DAL** agitando el tubo tan rápido como pueda.
- Centrifugue el tubo **DAL** a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- Incube el tubo **DAL** en un bloque de calor a 96 °C durante dos minutos.

Febrero de 2014

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15039608 Rev. A ESP | 19

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
M.N. 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



- 16 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.
- 17 Mantenga el tubo **DAL** en el baño de agua con hielo durante cinco minutos.

Carga de bibliotecas de muestras en cartuchos

- 1 Utilice una punta de pipeta de 1 ml independiente, limpia y vacía para perforar el sello metálico situado por encima del depósito del cartucho de reactivo etiquetado como **Load Samples** (Carga de muestras).
- 2 Pipetee 600 µl de las bibliotecas de muestra en el depósito **Load Samples** (Carga de muestras). Proceda con cuidado para evitar tocar el sello metálico al dispensar la muestra.
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.
- 3 Continúe directamente con los pasos de configuración del experimento con la interfaz de software operativo de MiSeq (MOS).

Configuración del experimento

- 1 Inicie sesión en el software operativo de MiSeq (MOS).
- 2 Seleccione **Sequence** (Secuenciar).
Se abrirá un conjunto de pantallas de configuración del experimento en el siguiente orden: Select Run Type (Seleccionar tipo de experimento), Load Flow Cell (Cargar celda de flujo), Load Reagents (Cargar reactivos), Review (Revisar) y Pre-Run Check (Comprobación previa al experimento).
- 3 Seleccione **Diagnostic Run** (Experimento diagnóstico).
- 4 Cuando aparezca la pantalla Load Flow Cell (Cargar celda de flujo), limpie la celda de flujo y, después, cárguela.
- 5 Cierre la puerta del compartimento de la celda de flujo y el cierre de la celda de flujo.
Tanto el cierre como la puerta del compartimento deben estar cerrados antes de iniciar el experimento.
Cuando la celda de flujo está cargada, el software lee y registra la RFID. Aparecerá una confirmación de que la RFID se ha leído correctamente en la esquina inferior derecha de la pantalla.
- 6 Cuando aparezca la pantalla Load Reagents (Cargar reactivos), vacíe la botella de residuos, cargue la botella de Solución SBS de MiSeqDx (PR2) y, a continuación, cargue el cartucho de reactivo.
Cuando la botella de solución SBS de MiSeqDx (PR2) y el cartucho de reactivo están cargados, el software lee y registra la RFID. Aparecerá una confirmación de que la RFID se ha leído correctamente en la esquina inferior derecha de la pantalla.
- 7 Seleccione la hoja de muestras correspondiente.
El software buscará de forma predeterminada un archivo de hoja de muestras cuyo nombre coincida con el número del código de barras del cartucho de reactivo cargado en el instrumento.
- 8 Confirme la configuración del experimento y los resultados de la comprobación previa al experimento.
- 9 Inicie el experimento.
La pantalla Sequencing (Secuenciación) se abre cuando empieza el experimento. Esta pantalla proporciona una representación visual del experimento en curso, incluidas las intensidades y las puntuaciones de calidad (puntuaciones Q).

Procedimientos de control de calidad

Las prácticas recomendadas de laboratorio indican que se incluya una muestra de ADN de control positivo y una muestra de control negativo (sin plantilla) en cada experimento. La muestra de ADN de control positivo debe contar con unas características bien definidas con variantes conocidas en la región de interés.

- Si un control sin plantilla genera un índice de llamada superior al 10 %, indica contaminación en el control sin plantilla. El protocolo se considera erróneo y, por lo tanto, se debe repetir todo el protocolo desde la preparación de bibliotecas.

9442



- La muestra de control positivo debe generar el resultado previsto. Si el control positivo genera un resultado distinto al previsto, indica un posible error en el seguimiento de la muestra o el registro incorrecto de los cebadores de índice. Se debe repetir todo el protocolo desde la preparación de bibliotecas.

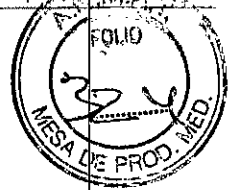
Febrero de 2014

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15039608 Rev. A ESP | 21

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Características de rendimiento

Precisión

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

Estudio 1

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

Los resultados de este estudio se muestran a continuación.

Febrero de 2014

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15039608 Rev. A ESP | 22

Dña. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
M.N. 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandra Diez
 Apodada
 Biosystems S.A.

Tabla 13 Datos de precisión en el nivel del amplicón del estudio 1 para la plataforma MiSeqDx

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

9442

Dra. SILVINA ZANELLA
 DIRECTORA TÉCNICA
 N.º 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

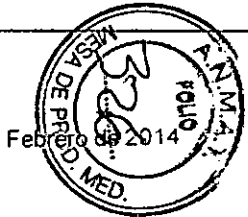


Dr. Alejandro Diez
Apodador
BioSystems S.A.

Amplificación	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplificación	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
16	3	130	-	13	15	130	0	130	0	100
17	3	117	-	13	15	117	0	117	0	100
18	3	136	Poli-T (5)	13	15	136	0	136	0	100
19	3	131	Poli-T (5), SNV	13	15	131	0	131	0	100
20	3	123	Poli-A (5)	13	15	123	0	123	0	100
21	3	117	Poli-A (6), Poli-T (5), Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	117	0	117	0	100
22	3	119	Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	119	0	119	0	100
23	3	120	-	13	15	120	0	120	0	100
24	3	129	Poli-T (5)	13	15	129	0	129	0	100
25	4	133	Poli-C (7), 66 % GC	13	15	133	0	133	0	100
26	4	135	Poli-C (5), 69 % GC	13	15	135	0	135	0	100
27	4	123	SNV	13	15	123	0	123	0	100
28	4	134	-	13	15	134	0	134	0	100

Dr. SILVANA ANECLA
DIRECCIÓN TÉCNICA
MN 14.42R
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Udo Alejandro Diez
 Gerente de
 Operaciones
 Biosystems S.A.

Amplificón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplificón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
29	4	132	-	13	15	132	0	132	0	100
30	4	121	Poli-A (5), SNV	13	15	121	0	121	0	100
31	4	125	-	13	15	125	0	125	0	100
32	4	134	Poli-T (5)	13	15	134	0	134	0	100
33	4	118	-	13	15	118	0	118	0	100
34	4	122	Poli-A (5)	13	15	122	0	122	0	100
35	4	131	-	13	15	131	0	131	0	100
36	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
37	4	128	Poli-T (6)	13	15	128	0	128	0	100
38	4	131	-	13	15	131	0	131	0	100
39	4	129	Poli-A (5), Poli-T (5), SNV	13	15	129	0	129	0	100
40	4	133	Poli-T (5), SNV	13	15	133	0	133	0	100
41	4	112	SNV	13	15	112	0	112	0	100
42	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
43	4	135	-	13	15	135	0	135	0	100

Dra. SILVIA PALANCA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MNN 14.411
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Lic. Alejandro Díez
 Responsable
 Biosystems S.A.

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
44	4	122	-	13	15	122	0	122	0	100
45	4	117	-	13	15	117	0	117	0	100
46 ⁹	4	124	-	13	15	125	0	125	0	100
47	4	117	Poli-T (5)	13	15	117	0	117	0	100
48	4	128	Poli-A (7)	13	15	128	0	128	0	100
49	4	123	Poli-A (6)	13	15	123	0	123	0	100
50	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
51	4	112	-	13	15	112	0	112	0	100
52	4	129	-	13	15	129	0	129	0	100
53	4	126	-	13	15	126	0	126	0	100
54	4	132	-	13	15	132	0	132	0	100
55	5	131	-	13	15	131	0	131	0	100
56	5	119	-	13	15	119	0	119	0	100
57	5	120	Poli-A (5)	13	15	120	0	120	0	100
58	5	119	-	13	15	119	0	119	0	100
59	5	118	-	13	15	118	0	118	0	100
60	5	112	-	13	15	112	0	112	0	100
61	5	120	-	13	15	120	0	120	0	100

Dra. SILVIA DE LA
 DIRECTORA TÉCNICA
 JAN 14 21
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Dr. Alejandro
Cabrero
Biosystems S.A.

Amplificón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplificón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
62	5	120	Poli-A (5)	13	15	120	0	120	0	100
63	5	115	CT(5)	13	15	115	0	115	0	100
64	5	112	SNV	13	15	112	0	112	0	100
65	5	135	Poli-T (6)	13	15	135	0	135	0	100
66	5	131	63 % GC	13	15	131	0	131	0	100
67	5	121	-	13	15	121	0	121	0	100
68	5	132	Poli-A (6), Poli-T (8)	13	15	132	0	132	0	100
69	7	133	-	13	15	133	0	133	0	100
70	7	120	60 % GC	13	15	120	0	120	0	100
71	7	135	-	13	15	135	0	135	0	100
72	7	126	Poli-A (5), 59 % GC	13	15	126	0	126	0	100
73	7	134	-	13	15	134	0	134	0	100
74	7	122	Poli-C (5), 63 % GC	13	15	122	0	122	0	100
75	7	127	59 % GC; SNV	13	15	127	0	127	0	100
76	7	123	-	13	15	123	0	123	0	100

Dr. SILVIA TANELLA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.431
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Lic. Alejandro Diez
 Responsable
 Biosystems S.A.

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
77	7	125	-	13	15	125	0	125	0	100
78	7	133	Poli-A (5), Poli-T (5)	13	15	133	0	133	0	100
79	7	116	-	13	15	116	0	116	0	100
80	7	135	-	13	15	135	0	135	0	100
81	7	118	-	13	15	118	0	118	0	100
82	7	136	67 % GC	13	15	136	0	136	0	100
83	7	131	58 % GC	13	15	131	0	131	0	100
84	7	119	Poli-G (6), 61 % GC	13	15	119	0	119	0	100
85	7	122	Poli-T (5)	13	15	122	0	122	0	100
86	7	123	Poli-A (6)	13	15	123	0	123	0	100
87	8	127	60 % GC	13	15	127	0	127	0	100
88	8	129	57 % GC	13	15	129	0	129	0	100
89	9	130	Poli-T (5)	13	15	130	0	130	0	100
90	9	116	-	13	15	116	0	116	0	100
91	9	119	Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	119	0	119	0	100
92	9	121	-	13	15	121	0	121	0	100

Dra. SILVIA FANELLA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



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

Lic. Alejandro Diez
 MODOBIO
 Biosystems S.A.

Dra. SILVINA LAJETA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.400
 BIOSYSTEMS S.A.



Dr. Alejandro Díez
 Apellido
 BIOSYSTEMS S.A.

Amplificación	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplificación	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
106	9	118	70 % GC	13	15	118	0	118	0	100
107	10	128	62 % GC	13	15	128	0	128	0	100
108	10	120	60 % GC	13	15	120	0	120	0	100
109	10	139	58 % GC; SNV	13	15	139	0	139	0	100
110	10	118	57 % GC	13	15	118	0	118	0	100
111	10	123	Poli-T (5)	13	15	123	0	123	0	100
112	10	121	-	13	15	121	0	121	0	100
113	10	129	26 % GC	13	15	129	0	129	0	100
114	10	122	-	13	15	122	0	122	0	100
115	10	124	Poli-T (5); Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	124	0	124	0	100
116	10	135	CA(4)	13	15	135	0	135	0	100
117	10	135	Poli-A (6); Región homóloga en un cromosoma diferente	13	15	135	0	135	0	100
118	10	119	Poli-C (5); SNV	13	15	119	0	119	0	100

Dr. SILVINA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Alejandro Diez
 Apoderado
 BIOSYSTEMS S.A.

Amplificón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplificón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
119	10	125	-	13	15	125	0	125	0	100
120	10	131	-	13	15	131	0	131	0	100
121	10	117	-	13	15	117	0	117	0	100
122	10	116	-	13	15	116	0	116	0	100
123	10	129	58 % GC	13	15	129	0	129	0	100
124	11	117	Poli-T (10)	13	15	117	0	117	0	100
125	11	117	Poli-T (5)	13	15	117	0	117	0	100
126	11	113	Poli-A (5)	13	15	113	0	113	0	100
127	11	129	-	13	15	129	0	129	0	100
128	11	121	Poli-T (5)	13	15	121	0	121	0	100
129	11	123	-	13	15	123	0	123	0	100
130	11	127	Poli-A (6)	13	15	127	0	127	0	100
131	11	136	Poli-T (6)	13	15	136	0	136	0	100
132	11	132	Poli-T (5)	13	15	132	0	132	0	100
133	11	115	-	13	15	115	0	115	0	100
134	11	117	Poli-T (8); 19 % GC	13	15	117	0	117	0	100
135	11	134	Poli-A (5); Poli-T (5)	13	15	134	0	134	0	100

Dra. SILVINA ZANETTI
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

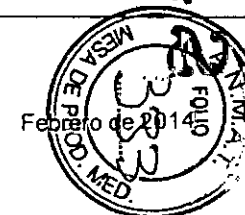
944



Dr. Alejandro Diez
 Apodado
 Biosystems S.A.

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
136	11	131	Poli-A (5)	13	15	131	0	131	0	100
137	11	133	26 % GC; SNV	13	15	133	0	133	0	100
138	11	137	Poli-T (8); SNV	13	15	137	0	137	0	100
139	11	131	Poli-A (5)	13	15	131	0	131	0	100
140	12	131	-	13	15	131	0	131	0	100
141	12	128	-	13	15	128	0	128	0	100
142	12	133	Poli-A (5)	13	15	133	0	133	0	100
143	12	136	-	13	15	136	0	136	0	100
144	12	124	-	13	15	124	0	124	0	100
145	12	122	59 % GC	13	15	122	0	122	0	100
146	13	122	-	13	15	122	0	122	0	100
147	13	116	Poli-C (5)	13	15	116	0	116	0	100
148	13	133	-	13	15	133	0	133	0	100
149	13	117	SNV	13	15	117	0	117	0	100
150	13	124	Poli-T (6)	13	15	124	0	124	0	100
151	13	123	Poli-T (5); 26 % GC	13	15	123	0	123	0	100

Dra. SILVIA ZANELLA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 1421
 BIOSYSTEMS S.A.

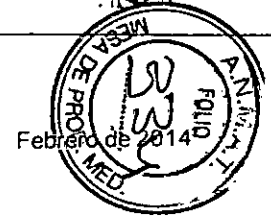


Dr. Alejandro Diez
 Apellido
 Biosystems S.A.

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
152	13	115	Poli-A (5)	13	15	115	0	115	0	100
153	13	125	-	13	15	125	0	125	0	100
154	13	121	-	13	15	121	0	121	0	100
155	13	123	-	13	15	123	0	123	0	100
156	13	114	-	13	15	114	0	114	0	100
157	13	119	-	13	15	119	0	119	0	100
158	14	122	58 % GC	13	15	122	0	122	0	100
159	16	122	-	13	15	122	0	122	0	100
160	16	121	-	13	15	121	0	121	0	100
161	16	123	Poli-C (5)	13	15	123	0	123	0	100
162	17	119	-	13	15	119	0	119	0	100
163	17	119	61 % GC	13	15	119	0	119	0	100
164	17	135	-	13	15	135	0	135	0	100
165	17	116	Poli-C (6); 60 % GC; SNV	13	15	116	0	116	0	100
166	17	123	-	13	15	123	0	123	0	100
167	17	116	62 % GC	13	15	116	0	116	0	100

9442

Dra. SILVINA ZANELLA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 1421
 BIOSYSTEMS S.A.



Lic. Alejandro Diez
 Responsable
 Biosystems S.A.

Amplicón	Cromosoma	Tamaño del fragmento analizado ¹	Contenido genómico del amplicón	N.º de muestras únicas	N.º total de muestras analizadas ²	N.º de llamadas por muestra que se pudo realizar ³	N.º de ausencia de llamadas ⁴	N.º de llamadas correctas por muestra ⁵	N.º de llamadas incorrectas ⁶	% de llamadas correctas ⁷
168	17	118	Poli-C (5); 65 % GC	13	15	118	0	118	0	100
169	17	129	-	13	15	129	0	129	0	100
170	17	131	Poli-G (6); 67 % GC; SNV	13	15	131	0	131	0	100
171	17	127	61 % GC	13	15	127	0	127	0	100
172	17	118	Poli-C (5)	13	15	118	0	118	0	100
173	17	138	61 % GC	13	15	138	0	138	0	100
174	17	131	58 % GC	13	15	131	0	131	0	100
175	18	112	-	13	15	112	0	112	0	100
176	18	124	-	13	15	124	0	124	0	100
177	18	134	Poli-A (6)	13	15	134	0	134	0	100
178	18	129	-	13	15	129	0	129	0	100
179	18	133	-	13	15	133	0	133	0	100
180	18	118	-	13	15	118	0	118	0	100
181	18	114	60 % GC	13	15	114	0	114	0	100
182	18	118	-	13	15	118	0	118	0	100

Dra. SILVANA ANIELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 1.421
 BIOSYSTEMS S.A.

04876

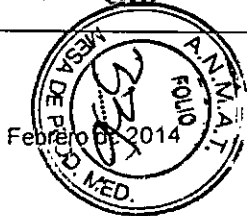


Lic. Alejandro Diez
Biosystems S.A.

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

9442

Dra. SILVANA LANEJA
DIRECTORA TÉCNICA
M.º 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



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



9442

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

Tabla 14 Coincidencia de los resultados de la llamada de bases de la plataforma MiSeqDx con los datos de referencia de 13 muestras bien definidas

Muestra	N.º de amplicones	% de cobertura de amplicones ¹	Variantes esperadas por muestra ²	Variantes llamadas correctamente	Variantes perdidas ³	Bases no variantes llamadas correctamente	Coincidencia de porcentaje positivo ⁴ (%)	Coincidencia de porcentaje negativo ⁵ (%)
NA12877	195	100	19	17	2	24 418	89,47	100
NA12878	195	100	19	17	2	24 417	89,47	100
NA12879	195	100	20	19	1	24 416	95,00	100
NA12880	195	100	20	18	2	24 417	90,00	100
NA12881	195	100	22	20	2	24 415	90,91	100
NA12882	195	100	16	15	1	24 419	93,75	100
NA12883	195	100	24	23	1	24 412	95,83	100
NA12884	195	100	21	20	1	24 415	95,24	100
NA12885	195	100	19	17	2	24 417	89,47	100
NA12886	195	100	22	20	2	24 415	90,91	100
NA12887	195	100	19	18	1	24 416	94,74	100
NA12888	195	100	24	23	1	24 412	95,83	100
NA12893	195	100	20	18	2	24 417	90,00	100

- ¹ El porcentaje de cobertura de amplicones es el número de bases de los amplicones secuenciados con confianza.
- ² Entre las variantes esperadas por muestra se incluyen tanto las variantes de nucleótido único como las inserciones y delecciones.
- ³ Para las variantes perdidas, consulte la primera tabla del estudio 1 y las notas al pie de la 8 a la 10.
- ⁴ Coincidencia de porcentaje positivo (PPA) = $100 \times TP / (TP + FN)$, donde los positivos verdaderos (TP) son el número de llamadas de variantes positivas en coordenadas genómicas donde las variantes se presentan de acuerdo con la secuencia de referencia y el alelo mutante llamado concuerda con la secuencia de referencia (columna llamada "Variantes llamadas correctamente") y los falsos negativos (FN) son el número de llamadas de variantes negativas en coordenadas genómicas donde las variantes se presentan de acuerdo con la secuencia de referencia (columna llamada "Variantes perdidas").
- ⁵ Coincidencia de porcentaje negativo (NPA) = $100 \times TN / (FP + TN)$, donde los falsos positivos (FP) son el número de llamadas de variantes positivas en coordenadas genómicas donde las variantes están ausentes de acuerdo con la secuencia de referencia, o si el alelo mutante llamado no concuerda con la secuencia de referencia (no se encuentra en la tabla, ya que no se realizaron llamadas de variantes de falsos positivos en este estudio) y los negativos verdaderos (TN) son el número de llamadas de variantes negativas en coordenadas genómicas donde las variantes están ausentes de acuerdo con el estándar de referencia (columna llamada "Bases no variantes llamadas correctamente").

Febrero de 2014

Lic. Alejandro Díez -
Abogado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15039608 Rev. A. ESP | 37

Dra. SILVIA ZANELA
DIRECTOR TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



9442

Estudio 2

Los resultados de la secuenciación del panel del amplicón anterior se compararon con un genotipo muy seguro definido para la NA12878 por el instituto de estándares y tecnología de EE. UU., National Institute of Standards and Technology (NIST) (v.2.15¹). De los 195 amplicones, 184 se encontraban dentro de llamadas de referencia muy seguras de la secuencia del NIST y se compararon. Las llamadas de bases no variantes se compararon con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano

Tabla 15 Comparación de los resultados de secuenciación de la plataforma MiSeqDx para la muestra NA12878 con la base de datos del NIST

Muestra	N.º de amplicones	% de cobertura de amplicones ²	Variantes esperadas	Variantes llamadas correctamente	Variantes perdidas	Bases no variantes llamadas correctamente	Coincidencia de porcentaje positivo ³ (%)	Coincidencia de porcentaje negativo ⁴ (%)
NA12878	184	100	17	16	1 ⁵	23 066	94,12	100

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

² El porcentaje de cobertura de amplicones es el número de bases de los amplicones secuenciados con confianza.

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

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

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

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

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



- 0442
- Tres de cuatro deleciones de una base se llamaron correctamente. Todas las llamadas correctas se realizaron en regiones no homopoliméricas en cuatro amplicones. No se llamó una deleción de una base en un experimento homopolimérico de 14 bases A en el cromosoma 9 en 63 amplicones.
 - Se llamaron correctamente deleciones de dos bases en una muestra.
 - Se llamaron correctamente deleciones de tres bases en 21 muestras.

Reproducibilidad

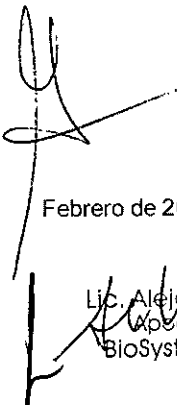
La reproducibilidad de la plataforma MiSeqDx se determinó con dos ensayos típicos.

Estudio 1

Se ha diseñado un ensayo típico para buscar una variedad de genes de 24 434 bases de 19 cromosomas diferentes con posibles exones clínicamente relevantes. En el estudio se analizaron 13 muestras en nueve experimentos con tres instrumentos MiSeqDx diferentes y tres operadores diferentes (Tabla 16). Se utilizaron dos lotes de consumibles de secuenciación y un único lote de reactivos de preparación de bibliotecas. Las 13 muestras corresponden a dos padres y 11 niños que varios laboratorios habían secuenciado con frecuencia mediante diferentes metodologías de secuenciación. Se analizaron dos muestras por duplicado, por lo que cada procesamiento generó resultados para 15 muestras.

Para la evaluación de la reproducibilidad lote a lote, se analizaron 94 muestras y dos controles sin plantilla de los tres lotes. Cada lote se dividió para la realización de dos experimentos de 48 muestras con el fin de analizar todos los reactivos y combinaciones de cebadores de índice posibles. Un único operador completó todos los experimentos de secuenciación con un único instrumento MiSeqDx con el fin de eliminar cualquier posible variación provocada por el operador o el instrumento (Tabla 17).

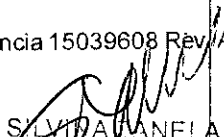
Se determinaron las llamadas correctas de las variantes de nucleótido único mediante la comparación de los datos del estudio con información de referencia bien fundamentada. No se obtuvieron experimentos erróneos ni se realizaron nuevos experimentos para el estudio de reproducibilidad. Las siguientes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



Febrero de 2014

Lic. Alejandro Diez
Wpederado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15039608 Rev/A ESP | 39



Dra. SILVIA MANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN/14.421
BIOSYSTEMS S.A.

L.P. Alejandro Díez
 Gerente
 Biosystems S.A.

Tabla 16 Resultados de reproducibilidad entre instrumentos del estudio 1 de la plataforma MiSeqDx (nivel del amplicón)

Ampli- cón	Cromoso- ma	Tamaño del framen- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- cón	N.º de mues- procesa- das ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das correcc- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das correcc- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das correcc- tas ⁵
1	1	132	Poli-C (5); 63 % GC	135	0	0	100	23 ⁶	0	99,61 ⁷	39 ⁶	0	99,34 ⁷
2	1	128	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	2	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	2	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
5	2	127	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
6	2	135	Poli-A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
7	2	122	Poli-T (5); Poli-C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
8	2	110	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
9	2	131	Poli-A (14)	135	0	27 ⁸	99,54	0	27 ⁶	99,54	0	27 ⁸	99,54
10	2	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
11	2	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
12	2	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
13	2	129	Poli-A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

9442

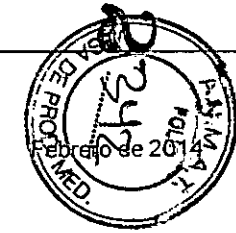
Dra. SILVIA MAZANZA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



Dr. Alpidio Diez
 Adolfo Carro
 Biosystems S.A.

Ampli- ción	Cromoso- ma	Tamaño del fragma- nto analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de mues- tras procesa- das ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corre- ctas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corre- ctas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corre- ctas ⁵
14	3	131	Poli-A (5); Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
15	3	130	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
16	3	130	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
17	3	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
18	3	136	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
19	3	131	Poli-T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
20	3	123	Poli-A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
21	3	117	Poli-A (6); Poli-T (5); Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
22	3	119	Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Dr. SKYNA ZANELLA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

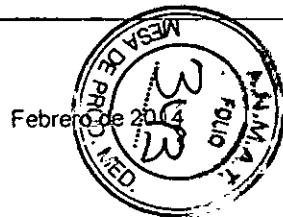


Lic. Alejandro Díez
 Apodadoro
 Biosystems S.A.

Ampli- ción	Cromoso- ma	Tamaño del fragmen- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
				N.º de mues- tras procesa- das ²	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corre- ctas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corre- ctas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corre- ctas ⁵
23	3	120	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
24	3	129	Poli-T (5)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
25	4	133	Poli-C (7); 66 % GC	135	0	100	0	0	100	0	0	100
26	4	135	Poli-C (5); 69 % GC	135	0	100	0	0	100	0	0	100
27	4	123	SNV	135	0	100	0	0	100	0	0	100
28	4	134	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
29	4	132	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
30	4	121	Poli-A (5); SNV	135	0	100	0	0	100	0	0	100
31	4	125	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
32	4	134	Poli-T (5)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
33	4	118	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
34	4	122	Poli-A (5)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
35	4	131	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
36	4	133	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100

Dra. SILVINA ZANIVELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 M.N. 14.471
 BIOSYSTEMS S.A.

304/2014
 27/2



Lic. Alejandro Diez
 Biosystems S.A.

Ampli- ción	Cromoso- ma	Número del fragmen- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de mue- stras ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵
37	4	128	Poli-T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
38	4	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
39	4	129	Poli-A (5); Poli-T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
40	4	133	Poli-T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
41	4	112	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
42	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
43	4	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
44	4	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
45	4	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
46	4	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
47	4	117	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
48	4	128	Poli-A (7)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
49	4	123	Poli-A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
50	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Dra. SILVINA...
 DIRECTORA TÉCNICA
 N.º 1421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Lic. Alejandro Diez
Asociados
Biosystems S.A.

Ampli- ción	Cromoso- ma	Tamaño del fragmen- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
				N.º de mues- tras procesa- das ²	N.º total de llama- das incorrect- tas ⁴	% de llama- das correct- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorrect- tas ⁴	% de llama- das correct- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorrect- tas ⁴	% de llama- das correct- tas ⁵
51	4	112	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
52	4	129	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
53	4	126	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
54	4	132	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
55	5	131	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
56	5	119	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
57	5	120	Poli-A (5)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
58	5	119	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
59	5	118	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
60	5	112	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
61	5	120	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
62	5	120	Poli-A (5)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
63	5	115	CT(5)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
64	5	112	SNV	135	0	100	0	0	100	0	0	100
65	5	135	Poli-T (6)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
66	5	131	63 % GC	135	0	100	0	0	100	0	0	100

Dra. SILVINA ANTONIA
DIRECTORA GENERAL
MN 143
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Dr. Alejandro Díez
 Abolador
 Biosystems S.A.

Ampli- ción	Cromoso- ma	tamaño del fragmen- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de mues- tras ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das correc- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das correc- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das correc- tas ⁵
67	5	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
68	5	132	Poli-A (6); Poli-T (8)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
69	7	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
70	7	120	60 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
71	7	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
72	7	126	Poli-A (5); 59 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
73	7	134	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
74	7	122	Poli-C (5); 63 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
75	7	127	59 % GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
76	7	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
77	7	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
78	7	133	Poli-A (5); Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
79	7	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Dra. SILVINA ZAMELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 M.º 14.4.21
 BIOSYSTEMS S.A.

0442



Lic. Alejandro Diez
 Kddkdd
 Biosystems S.A.

Ampli- ción	Cromoso- ma	Tamaño del fragmen- to analiza- do	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de mues- procesa- das ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵
80	7	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
81	7	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
82	7	136	67 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
83	7	131	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
84	7	119	Poli-G (6); 61 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
85	7	122	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
86	7	123	Poli-A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
87	8	127	60 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
88	8	129	57 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
89	9	130	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
90	9	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
91	9	119	Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
92	9	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Dra. SILVINA ZANENI
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

0442

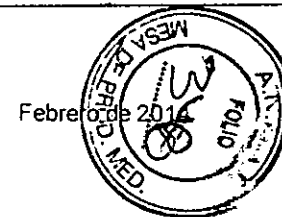


Lic. Alejandro Diez
 Miodo Acrio-
 Biosystems S.A.

Ampli- ción	Cromoso- ma	Tamaño del fragmen- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de mue- stras procesa- das ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵
93	9	117	Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
94	9	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
95	9	129	Poli-A (14)	135	0	45 ⁶	99,22	0	45 ⁶	99,22	0	45 ⁶	99,22
96	9	114	Región homóloga en un cromosoma diferente; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
97	9	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
98	9	127	Poli-A (5); Poli-C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
99	9	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
100	9	138	64 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
101	9	139	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
102	9	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Dra. SILVANA ANEIA
 DIRECTORA TECNICA
 M. 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

0442



Lid. Alejandro Diez
 Apoyado por
 Biosystems S.A.

Ampli- ción	Cromoso- ma	Tamaño del framen- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de mue- stras ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵
103	9	133	Poli-A (5); 57 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
104	9	138	57 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
105	9	136	Poli-C (5); 67 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
106	9	118	70 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
107	10	128	62 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
108	10	120	60 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
109	10	139	58 % GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
110	10	118	57 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
111	10	123	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
112	10	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
113	10	129	26 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
114	10	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Dra. SILVANA ANELA
 DIRECTORA TECNICA
 MN 4421
 BIOSYSTEMS S.A.

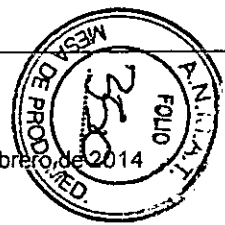
9442



Dr. Alejandro Piez
Laboratorio
BioSystems S.A.

Ampli- ción	Cromoso- ma	Tamaño del fragmen- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de mues- tras procesa- das ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorrec- tas ⁴	% de llama- das correc- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorrec- tas ⁴	% de llama- das correc- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorrec- tas ⁴	% de llama- das correc- tas ⁵
115	10	124	Poli-T (5); Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
116	10	135	CA(4)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
117	10	135	Poli-A (6); Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
118	10	119	Poli-C (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
119	10	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
120	10	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
121	10	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
122	10	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
123	10	129	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
124	11	117	Poli-T (10)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Dra. SILVANA ZANELLA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 1421
BIOSYSTEMS S.A.

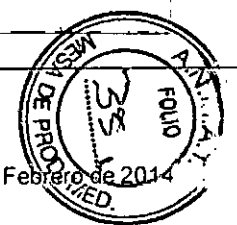


Lit. Alejandro Diez
 Apodado
 Biosystems S.A.

Ampli- ción	Cromoso- ma	Número del fragmento analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de mues- tras ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵
125	11	117	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
126	11	113	Poli-A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
127	11	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
128	11	121	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
129	11	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
130	11	127	Poli-A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
131	11	136	Poli-T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
132	11	132	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
133	11	115	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
134	11	117	Poli-T (8); 19 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
135	11	134	Poli-A (5); Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
136	11	131	Poli-A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
137	11	133	SNV; 26 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
138	11	137	Poli-T (8); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

0442

Dra. SILVANA
 DIRECTORA TÉCNICA
 BIOSYSTEMS S.A.



Dr. Alejandro Diez
 Capileiro
 Biosystems S.A.

Ampli- ción	Cromoso- ma	Tamaño del fragmen- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
				N.º de mue- stras procesa- das ²	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵
139	11	131	Poli-A (5)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
140	12	131	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
141	12	128	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
142	12	133	Poli-A (5)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
143	12	136	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
144	12	124	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
145	12	122	59 % GC	135	0	100	0	0	100	0	0	100
146	13	122	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
147	13	116	Poli-C (5)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
148	13	133	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
149	13	117	SNV	135	0	100	0	0	100	0	0	100
150	13	124	Poli-T (6)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
151	13	123	Poli-T (5); 26 % GC	135	0	100	0	0	100	0	0	100
152	13	115	Poli-A (5)	135	0	100	0	0	100	0	0	100
153	13	125	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100
154	13	121	-	135	0	100	0	0	100	0	0	100

Dra. S. MINOZZA
 DIRECTORA TECNICA
 BIOSYSTEMS S.A.

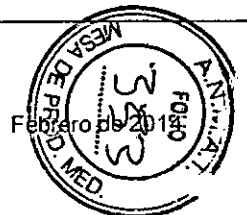


Lic. Alejandro Diez
 Apudayado
 Biosystems S.A.

Ampli- ción	Cromoso- ma	Número del fragemen- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de mue- procesa- das ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵
155	13	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
156	13	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
157	13	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
158	14	122	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
159	16	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
160	16	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
161	16	123	Poli-C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
162	17	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
163	17	119	61 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
164	17	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
165	17	116	Poli-C (6); 60 % GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
166	17	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
167	17	116	62 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
168	17	118	Poli-C (5); 65 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Dra. SILVIA ZANZANI
 DIRECTORA DE CALIDAD
 MN 14.217
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Lic. Alejandro Diez
 Apodilado
 BIOSYSTEMS S.A.

Ampli- ción	Cromoso- ma	Tamaño del fragmen- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de mue- stras ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das corec- tas ⁵
169	17	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
170	17	131	Poli-G (6); 67 % GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
171	17	127	61 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
172	17	118	Poli-C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
173	17	138	61 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
174	17	131	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
175	18	112	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
176	18	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
177	18	134	Poli-A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
178	18	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
179	18	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
180	18	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
181	18	114	60 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
182	18	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Dra. SILVINA ZERLIN
 DIRECTORA TÉCNICA
 M.N. 14.721
 BIOSYSTEMS S.A.



Urd. Alejandro Díez
 Apodarse
 Biosystems S.A.

Ampli- ción	Cromoso- ma	Tamaño del fragmen- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de mues- tras procesa- das ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorrec- tas ⁴	% de llama- das correc- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorrec- tas ⁴	% de llama- das correc- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorrec- tas ⁴	% de llama- das correc- tas ⁵
183	19	122	Poli-G (6); 66 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
184	19	139	64 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
185	19	131	67 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
186	19	141	59 % GC; Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
187	19	121	Poli-C (5); 72 % GC; Región homóloga en un cromosoma diferente	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
188	19	138	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
189	19	123	64 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
190	19	138	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
191	20	117	Poli-T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Dra. S. I. VINAZ
 DIRECTORA TECNICA
 MAN. 1. 42
 BIOSYSTEMS S.A.

442



Lic. Alejandro Diez
 Bpdero
 Biosystems S.A.

Ampli- ción	Cromo- soma	Tamaño del fragmen- to analiza- do ¹	Contenido genómico del ampli- ción	N.º de mues- tras procesa- das ²	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das correcc- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das correcc- tas ⁵	N.º total de ausen- cia de llama- das ³	N.º total de llama- das incorec- tas ⁴	% de llama- das correcc- tas ⁵
192	22	136	Poli-A (7)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
193	22	122	Poli-A (5); Poli-C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
194	22	122	62 % GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
195	22	119	66 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

- ¹ "Fragmento analizado" se refiere al tamaño de la región genómica secuenciada en bases, sin incluir cebadores específicos según el objetivo.
- ² El número de muestras se calcula a partir de 9 experimentos de 15 muestras (11 muestras procesadas una vez y 2 procesadas dos veces).
- ³ El número total de ausencia de llamadas es el número combinado de ausencias de llamadas obtenido para los 45 experimentos mediante el análisis del amplicón específico con un instrumento MiSeqDx especificado.
- ⁴ El número total de llamadas incorrectas es el número combinado de llamadas incorrectas obtenido para los 45 experimentos mediante el análisis del amplicón específico con un instrumento MiSeqDx especificado.
- ⁵ El porcentaje de llamadas correctas es igual al índice de llamadas correctas de todas las bases del amplicón, donde la llamada correcta de las SNV (variantes de nucleótido único) o inserciones y deleciones se basa en la base de datos de referencia bien definida, y la llamada correcta de las bases en el resto de la secuencia del amplicón se basa en la comparación con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano. Esta columna puede incluir más de un resultado esperado para un amplicón dado si se espera que algunas de las muestras contengan una inserción/delección y otras no como, por ejemplo, el amplicón 9.
- ⁶ El amplicón 1 presentó un número de bases cuyo genotipo no se pudo llamar: 12 bases en 1/9 experimentos en NA12881; una base en 2/9 experimentos y tres bases en 1/9 experimentos en NA12886; 20 bases en 1/9 experimentos y 26 bases en 1/9 experimentos en NA12888. Esto se debe a una cobertura baja en bases de ausencia de llamadas de dichos experimentos, donde la profundidad de la secuenciación media fue de 33,2, con un mínimo de 21 y un máximo de 52.
- ⁷ Cuando no se incluyen ausencias de llamadas en el cálculo, el índice de llamadas correctas es del 100 %.
- ⁸ El amplicón 9 incluye un experimento homopolimérico de 14 bases A de acuerdo con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano. No obstante, la información de referencia bien definida para 7 de 13 muestras tiene 13 bases A en este experimento homopolimérico. En estas siete muestras, esta delección de un par de bases se llama falso negativo y, asimismo, como falsos negativos reproducibles en los nueve experimentos.
- ⁹ El amplicón 95 incluye un experimento homopolimérico de 14 bases A de acuerdo con el conjunto 19 de la secuencia de referencia del genoma humano. No obstante, las secuencias de información de referencia bien definidas para 13 de 13 muestras tienen 15 bases A en este experimento homopolimérico. En estas 13 muestras, esta inserción de un par de bases no se llama de forma reproducible al 100 % (es decir, es un falso negativo).

Dra. SILVIA ZAMATA
 DIRECTORA
 TECNICA
 MN 14 121
 BIOSYSTEMS S.A.

0442



Lic. Alejandro Diez
 Gerente General
 Biosystems S.A.

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

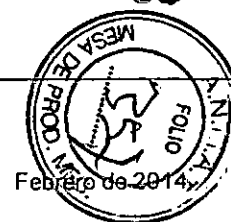
Tabla 17 Resumen de los resultados de reproducibilidad de la plataforma MiSeqDx de 13 muestras bien definidas

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

¹ Falso positivo = Variante llamada por el experimento de secuenciación de MiSeqDx que no se encuentra en la base de datos de referencia.
² Falso negativo = Variante que se encuentra en la base de datos de referencia y no se llamó en el experimento de secuenciación de MiSeqDx.
³ Las muestras NA12877 y NA12878 se analizaron por duplicado. Las muestras duplicadas arrojaron resultados idénticos.

Dra. SILVIA ZAVALLA
 DIRECTORA TÉCNICA
 Biosystems S.A.

5442



Lic. Alejandro Diez
 Responsable
 Biosystems S.A.

Estudio 2

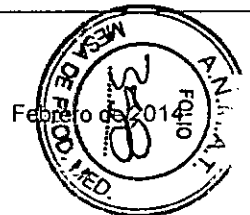
En un estudio de reproducibilidad en varios centros realizado con un ensayo típico, el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina, se incluyó un subconjunto de variaciones genéticas de *CFTR* de interés clínico analizado con el software de MiSeq Reporter mediante el flujo de trabajo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

Tabla 18 Resumen de los resultados del estudio de reproducibilidad realizado con un ensayo representativo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx

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 ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4 ¹	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 ¹	100	100	100
A	5 ²	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 ²	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Dra. SILVIA ZANIELA
 DIRECTORA CLÍNICA
 MN 14.21
 BIOSYSTEMS S.A.

9442

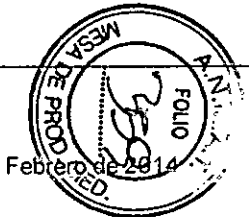


Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 Biosystems S.A.

Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por ciento	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	9 ^a	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ^a	0	97,22	99,96	99,92
A	10 ^a	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ^a	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C ausente	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T) 9/(TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100

Dra. SILVIA ZINELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 N.º 14421
 BIOSYSTEMS S.A.

3442



Lic. Alejandro Diez
 Responsable de
 Biosystems S.A.

Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes			Llamadas coincidentes negativas (estado positivas (variantes))			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Dra. SILVINA ZANANA
 DIRECTORA DE
 OPERACIONES
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Dr. Alejandro Diez
Apodado
BioSystems S.A.

Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes			Llamadas coincidentes negativas (estado positivas (variantes))			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
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+10 (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+ (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del ((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		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (I		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 (I-		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HO		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Dr. SILVANA ZANKEIA
DIRECCIÓN TÉCNICA
P.N. 427
BIOSYSTEMS S.A.

0442

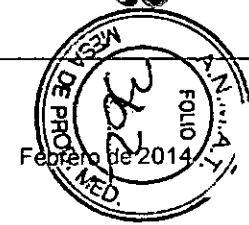


Dr. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes			Llamadas coincidentes negativas (estado positivas (variantes))			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
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

Dra. Susana Anella
DIRECTORA TECNICA
M 14 421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Lic. Alejandro Diez
 Abodolcabo
 Biosystems S.A.

Pa- nel	N.º de mues- tra	Genotipo de muestra	Variantes	Llama- das totales por centro	Llamadas coincidentes			Llamadas coincidentes negativas (estado positivas (variantes))			N.º de llama- das incorec- tas	N.º de ausencia de llama- das	Coinciden- cia positiva (%)	Coinciden- cia negativa (%)	Coinciden- cia total (%)
					Cent- tro 1	Cent- tro 2	Cent- tro 3	Cent- tro 1	Cent- tro 2	Cent- tro 3					
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 ¹	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 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
B	75 ²	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 ²	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Dra. SILVIA MAZARELLA
 DIRECTORA CLINICA
 MN 4.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Lidia Alejandra Díez
 Responsable de
 Biosystems S.A.

Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes			Llamadas coincidentes negativas (estado positivas (variantes))			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	78	1812-1 G>A (HE)		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 (810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del ((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 (HO		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86	CFTR dele2, 3/F: (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	14	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1C (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/2143del (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

Dra. SILVIA ZARZUELA
 DIRECTORA DE INGENIERIA
 MN 14 22
 BIOSYSTEMS S.A.



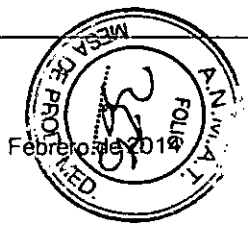
Uc Alejandro Pérez
 Kollerode
 Biosystems S.A.

Pa- nel	N.º de mue- stra	Genotipo de muestra	Variantes	Llama- das totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (estado natural)			N.º de llama- das incorec- tas	N.º de ausencia de llama- das	Coinciden- cia positiva (%)	Coinciden- cia negativa (%)	Coinciden- cia total (%)
					cen- tro 1	cen- tro 2	cen- tro 3	cen- tro 1	cen- tro 2	cen- tro 3					
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Total				74 556	2209			221 182			4	273	99,77	99,88	99,88

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

DR. SANDRA ZANELLA
 DIRECTORA TÉCNICA
 N.º 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



9442

Extracción de ADN

Se evaluaron tres métodos de extracción distintos, extracción de bolas magnéticas, precipitación por alcohol y aislamiento de la columna de filtrado de silicio, con sangre total anticoagulada con EDTA K₂. Se utilizaron 14 muestras de sangre únicas en el estudio, lo que representaba un rango de genotipos de un gen representativo. Dos operadores diferentes comprobaron independientemente los tres métodos de extracción de ADN. Cada operador llevó a cabo tres experimentos por método de extracción. Cada operador realizó cada una de las extracciones en días diferentes. La concentración de ADN y el índice de A260/A280 de las muestras de ADNg extraídas se determinaron mediante espectrometría. El tamaño de las muestras total para cada método de extracción en este estudio fue de 168 (14 muestras x 2 operadores/métodos de extracción x 3 experimentos/operador x 2 duplicados/muestras de ADNg extraídas).

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

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

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

Entrada de ADN

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

Las entradas de ADN de 1250 ng, 250 ng y 100 ng se volvieron a analizar con cuatro muestras de ADN representativas y 20 duplicados por nivel de entrada de ADN de cada muestra ($n=4 \times 20=80$ 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 de primer paso fueron del 100 % en todos los niveles de entrada de ADN, mientras que los índices de llamada de muestras fueron del >99 %.

Sustancias interferentes

Para evaluar el impacto de las sustancias interferentes en la plataforma MiSeqDx, se utilizó un ensayo típico diseñado para buscar un solo gen en 11 529 bases en presencia y ausencia de posibles sustancias interferentes. En el estudio, se utilizaron ocho muestras de sangre total que representaban ocho genotipos únicos. Se analizaron cuatro sustancias interferentes endógenas (bilirrubina, colesterol, hemoglobina y triglicéridos) añadiéndolas a las muestras de sangre antes de la extracción de ADN. Para evaluar la interferencia resultante de la extracción de sangre (extracción breve), se añadió EDTA a las muestras de sangre en dos concentraciones. En la tabla siguiente se muestran los límites de

Febrero de 2014

N.º de referencia 15039608 Rev. A ESP | 65

Lic. Alejandro Diez
 Representante
 BioSystems S.A.

Dra. SILVIA AZNUELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 N.º 4.421
 BIOSYSTEMS S.A.



9442

concentración de cada sustancia. Asimismo, para evaluar la interferencia resultante de la preparación de muestras, se añadió tampón de lavado al 15 % a ocho ADN genómicos purificados. Se consiguió un índice de llamada del 100 % con todas las muestras analizadas, así como una reproducibilidad del 100 % en las llamadas de genotipo entre muestras en presencia y ausencia de sustancias interferentes.

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

Indexación de muestras

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

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

Patentes y marcas registradas

Este documento y su contenido son propiedad de Illumina, Inc. y sus afiliados ("Illumina") y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes en conexión con el uso de los productos descritos en él y no para ningún otro fin. Este documento y su contenido no se utilizarán ni distribuirán con ningún otro fin ni tampoco se 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 ni similares derechos de terceros.

Para asegurar el uso correcto y seguro de los productos descritos en este documento, 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 AL PRODUCTO, LESIONES A LAS PERSONAS, INCLUIDOS LOS USUARIOS Y OTROS, Y DAÑOS A OTRA PROPIEDAD.

ILLUMINA NO ASUME RESPONSABILIDAD ALGUNA QUE SURJA DEL USO INCORRECTO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS LAS PIEZAS O EL SOFTWARE) NI DEL USO DE DICHS PRODUCTOS FUERA DEL ÁMBITO DE LAS LICENCIAS EXPRESAS ESCRITAS O PERMISOS OTORGADOS POR ILLUMINA EN CONEXIÓN CON LA ADQUISICIÓN DE DICHS PRODUCTOS POR PARTE DE LOS CLIENTES.

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

© 2012-2014 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Illumina y MiSeqDx son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de Illumina, Inc. Todas las demás marcas y nombres mencionados en el presente documento pertenecen a sus respectivos propietarios.

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

Lic. Alejandro Díez
 Responsable
 BioSystems S.A.

Dra. SILVANA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 M. 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442

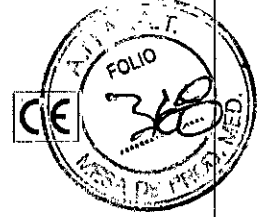
Información de contacto



Illumina
San Diego, 92122 California (EE. UU.)
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuera de Norteamérica)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH La Haya
Países Bajos



Etiquetado de productos

Consulte la leyenda de los símbolos que se proporciona con cada kit para obtener información completa sobre los símbolos que pueden aparecer en el embalaje o el etiquetado de los productos.

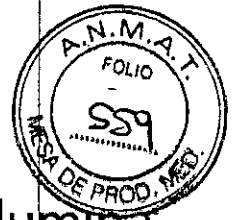
Febrero de 2014

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15039008 Rev. A ESP | 67

Dra. SILVIA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
N.º 14 421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



illumina

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

N.º de catálogo DX-102-1001: Seis experimentos, hasta 48 muestras por kit

Uso previsto

El Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx de Illumina es un sistema de diagnóstico *in vitro* de secuenciación selectiva que secuencia de nuevo las regiones codificadoras 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 de muestras de sangre humana total periférica recogidas en EDTA K₂. 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 destinada para su uso en el instrumento MiSeqDx de Illumina.

La prueba se ha diseñado para utilizarla como ayuda en el diagnóstico de personas con síntomas de fibrosis quística. 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 en genética molecular clínica o equivalente certificado y se deben utilizar junto con otra información disponible como, por ejemplo, los síntomas clínicos, otras pruebas diagnósticas y el historial familiar.

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

Resumen y explicación del ensayo

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 hispanica.^{1,5} 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, lo que provoca enfermedades multisistémicas complejas en varios órganos.^{2,4} Cabe destacar que los pulmones son el principal sistema anatómico asociado con la morbilidad y mortalidad.⁶ En muchos casos, el deterioro nutricional presagia la progresión de la enfermedad pulmonar de la FQ. En consecuencia, un enfoque clave de los esfuerzos intervencionistas actuales es el diagnóstico precoz mediante el cribado de los recién nacidos⁵, lo que permite facilitar un acceso a tiempo a los servicios médicos fundamentales y garantizar el mejor resultado posible para las personas que padecen esta enfermedad.^{2,5} 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.⁶

Variantes e incidencia de la 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.² 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.^{2,3} En la actualidad, hay más de 1900 variantes de CFTR descritas, y la mayoría de ellas son mutaciones puntuales.⁷ La variante más habitual de la CFTR es el alelo F508del³, que representa casi un 70 % de todas las variantes de la CFTR.¹ No obstante, a menudo,

Abril de 2014

Lis. Alejandro Díez
Apodado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15083344 Rev. A ESP | 1

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

otras variantes habituales de la *CFTR* suelen conllevar el fenotipo de la FQ y otras enfermedades relacionadas con la *CFTR*.¹⁻³

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.² Se da en todas las poblaciones étnicas y raciales en frecuencias distintas: una de cada 3000 personas de origen caucásico, uno de cada 9200 hispanoamericanos, uno de cada 10 900 americanos nativos, uno de cada 15 000 afroamericanos y uno de cada 31 000 asiático-americanos.^{2,4} No obstante, cada vez es más difícil la asignación de una etnia determinada a una persona afectada.⁸ En la Tabla 1 se proporcionan los cálculos actuales de frecuencia de portadores de la mutación de *CFTR* por etnias 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.⁹

Grupo étnico	Frecuencia de portadores observada
Afroamericano	1 en 84
Judío asquenazi	1 en 29
Asiático	1 en 242
Caucásico	1 en 28
Hispano	1 en 59
Judío	1 en 32
De Oriente Medio	1 en 91
Americano nativo	1 en 70
Sudasiático	1 en 118
Otra etnia	1 en 111
Más de un origen étnico	1 en 34
Mitad afroamericano	1 en 56
Mitad caucásico	1 en 32
Mitad hispano	1 en 51
No se indica	1 en 37
Todos los individuos	1 en 38

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 (*CFTR*dele2,3 y *CFTR*dele22,23) y la región Poli-TG/Poli-T. La cobertura total del ensayo se muestra en las posiciones de las coordenadas genómicas que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx Cobertura de las coordenadas genómicas

	Inicio de la coordenada genómica hg19 (cromosoma 7)	Detención de la coordenada genómica hg19 (cromosoma 7)	Longitud (par de bases)
CFTR_Exon 1	117120041	117120211	171
CFTR_Exon 2	117144297	117144427	131

2 | N.º de referencia 15038344 Rev. A ESP

Abril de 2014

Lic. Alejandro Diez
 Representante
 BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeq[™]

	Inicio de la coordenada genómica hg19 (cromosoma 7)	Detención de la coordenada genómica hg19 (cromosoma 7)	Longitud (par de bases)
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

Abril de 2014

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15038344 Rev. ESP 3

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

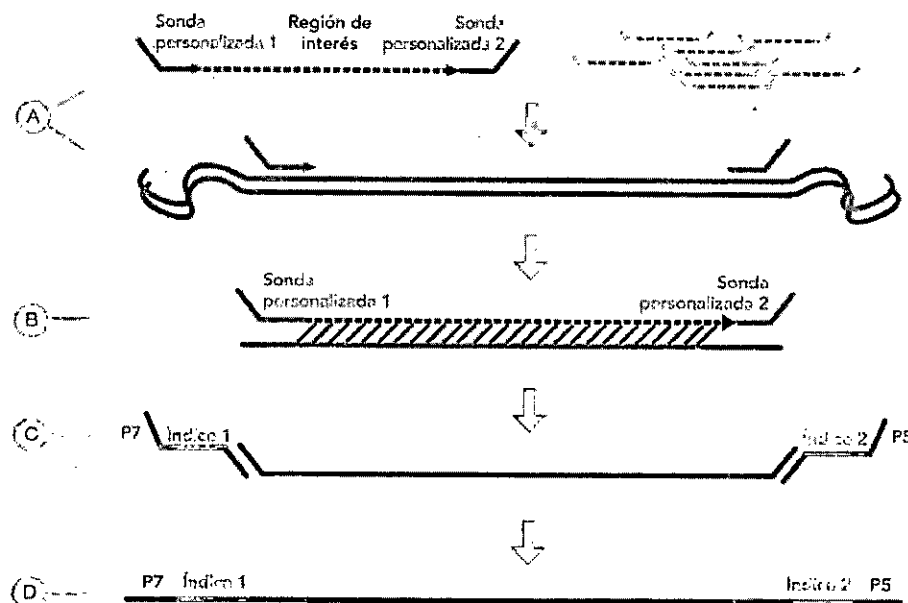
	Inicio de la coordenada genómica hg19 (cromosoma 7)	Detención de la coordenada genómica hg19 (cromosoma 7)	Longitud (par de bases)
CFTR_Exon 27	117306952	117307262	311
Total de bases			5203**

- ^ 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. De este modo, se evitan 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, se incluye la secuencia intrónica adyacente de 30 nt 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 del procedimiento

El Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx de Illumina conlleva dos procedimientos principales. El primer procedimiento consiste en preparar manualmente las muestras para la secuenciación, lo que se denomina preparación de bibliotecas. La preparación de bibliotecas consta de cuatro pasos clave: la hibridación, la extensión-ligadura, la amplificación PCR y la normalización de bibliotecas. El segundo procedimiento consiste en secuenciar la muestra preparada mediante el uso de la química de SBS (secuenciación por síntesis) en MiSeqDx.

Preparación de bibliotecas



- A Hibridación:** El primer paso, la hibridación, hibridiza un grupo de oligonucleótidos ascendentes y descendentes específico del Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx en relación con el ADN genómico de la muestra. 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.

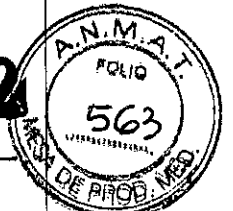
4 | N.º de referencia 15038344 Rev. A ESP

Lic. Alejandro Diez
 BioSystems S.A.

Dr. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

Abril de 2014

9442



- B Extensión-ligadura:** El segundo paso, la extensión-ligadura, conecta los oligonucleótidos ascendentes y descendentes hibridados. Una ADN polimerasa se extiende desde los oligonucleótidos ascendentes hasta la región objetivo, a lo que le sigue la ligadura hasta el extremo 5' del oligonucleótido descendente con una ADN ligasa. 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 de 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 se vale de un método basado en terminadores reversibles para detectar bases de nucleótido único 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 minimiza la tendencia a la incorporación. Las llamadas de bases se realizan directamente a partir de las mediciones de intensidad de la señal durante cada ciclo de secuenciación. El resultado final es la secuenciación base por base.

Análisis de datos

MiSeq Reporter procesa las llamadas de bases generadas durante el análisis principal y genera información sobre cada muestra según la información especificada en la hoja de muestras, lo que se denomina análisis secundario. El análisis secundario incluye el demultiplexado, la generación de archivos FASTQ, la alineación, las llamadas de variantes y la generación de archivos VCF que contienen información sobre las variantes de CFTR que se encuentran en posiciones específicas del genoma de referencia.

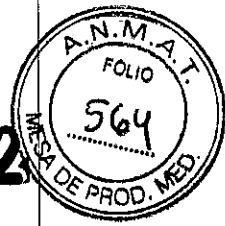
- **Demultiplexado:** Es el primer paso del análisis secundario si la hoja de muestras contiene varias muestras y el experimento tiene lecturas de índice. El demultiplexado separa datos de las muestras agrupadas en función de los índices de secuencia únicos que se añadieron durante el paso de amplificación PCR.
- **Generación de archivos FASTQ:** Tras el demultiplexado, MiSeq Reporter genera archivos intermedios en 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. MiSeq Reporter utiliza un algoritmo de Smith-Waterman de bandas que realiza las alineaciones de secuencias locales para determinar regiones similares entre dos secuencias.
- **Llamadas de variantes:** Este paso registra las variantes de nucleótido único (SNV), las inserciones y deleciones, y otras variantes estructurales en un archivo de texto normalizado y analizable llamado MiSeqDxClinicalSequencingAssay.txt. Para obtener más información, consulte la sección Archivo del informe del análisis de la *Guía del usuario de MiSeq Reporter (n.º de referencia 15038356_ESP)*.

Abril de 2014

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15088344 Rev. A ESP | 5

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



9 4 4 2

Limitaciones del procedimiento

- 1 El ensayo secuencia las siguientes regiones del gen CFTR:
 - a Todas las regiones de codificación de proteínas del gen CFTR en 27 exones
 - b Entre 5 y 10 bases de secuencia intrónica adyacente
 - c Cien nucleótidos de secuencia intrónica en las regiones no traducidas 5' y 3'
 - d Dos mutaciones intrónicas profundas (1811+1.6kbA>G y 3489+10kbC>T)
 - e La secuencia Poli-TG/Poli-T ubicada en el intrón 9
 - f Un total de 5206 posiciones/regiones de los 188 702 pares de bases posibles en el gen
- 2 Para uso diagnóstico *in vitro*. Los resultados obtenidos con el Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx de Illumina se deben utilizar e interpretar en el marco de una evaluación clínica completa.
- 3 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 "cepa salvaje" no garantiza que otras mutaciones/variantes del CFTR no estén presentes en las muestras que se están analizando.
 - El ensayo está diseñado para detectar dos deleciones grandes específicas: CFTRdele2,3 y CFTRdele22,23. No se detectarán ni notificarán otras deleciones grandes. Este ensayo solo está validado para las inserciones y deleciones de hasta 3 bp.
- 4 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.
- 5 Del mismo modo que con cualquier ensayo basado en hibridación, los polimorfismos o las mutaciones subyacentes en regiones de oligonucleótidos unidos pueden afectar a los alelos que se estén comprobando y, en consecuencia, a las llamadas realizadas.
- 6 Si se identifican más de dos variantes para una muestra, se recomienda que el usuario verifique el resultado repitiendo la muestra con el Sistema del instrumento 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. Este ensayo no puede determinar si las variantes están en orientación cis-trans respecto de otras variantes.
- 7 En el software de MiSeq Reporter, todas las inserciones y deleciones se dejarán alineadas en regiones homopoliméricas. Por ejemplo, la variante 444delA se identificará como deleción GA-TC, mientras que la deleción se identificará en dbSNP como deleción G-ATC. La excepción a este caso son las 135 variantes de FQ que se enumeran en el CFTR2 como causantes de la enfermedad (según una lista de variantes con fecha de septiembre de 2013). Según el CFTR2¹⁰, todas las inserciones y deleciones en regiones homopoliméricas de este conjunto de variantes coinciden con la identificación de variantes esperada.
- 8 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.
- 9 Este ensayo se ha diseñado para realizarlo exclusivamente en un formato de ocho unidades. Si no hay seis muestras clínicas disponibles, excluidos los controles positivos y negativos, incluya otras muestras de ADN genómico humano para completar el experimento.

Componentes del producto

La plataforma MiSeqDx de Illumina consta de lo siguiente:

- Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx (n.º de catálogo DX-102-1001)

6 | N.º de referencia 15038344 Rev. A ESP

Lic. Alejandro Diez
Aprobado
BioSystems S.A.

Abril de 2014

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

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

Reactivos

Reactivos suministrados

Ilumina proporciona los reactivos para el Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx de Ilumina (n.º de catálogo DX-102-1001). Este kit se ha configurado para seis experimentos con un máximo de ocho muestras por experimento (hasta un total de 48 muestras).

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx, caja 1

Tabla 3 Reactivos de preamplificación de la caja 1A

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Grupo de oligonucleótidos del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística	1 tubo	600 µl	Solución acuosa tamponada que contiene oligonucleótidos específicos para el gen <i>CFTR</i>	Entre -25 °C y -15 °C
Tampón de hibridación	1 tubo	4,32 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales y formamida	Entre -25 °C y -15 °C
Mezcla de extensión-ligadura	1 tubo	4,8 ml	Solución acuosa tamponada que contiene una mezcla patentada de ADN polimerasas, ADN ligasa y dNTP	Entre -25 °C y -15 °C
Cebadores de índice C (A503), D (A504) y E (A505)	1 tubo por cebador	192 µl	Cebadores de PCR con secuencias de índice y adaptadores de secuenciación	Entre -25 °C y -15 °C
Cebadores de índice 1 (A701), 2 (A702) y 10 (A710)	1 tubo por cebador	128 µl	Cebadores de PCR con secuencias de índice y adaptadores de secuenciación	Entre -25 °C y -15 °C
Polimerasa de PCR	1 tubo	56 µl	ADN polimerasa patentada	Entre -25 °C y -15 °C
Mezcla maestra de PCR	1 tubo	2,8 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales y dNTP	Entre -25 °C y -15 °C

Tabla 4 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 °C y -15 °C
Tampón de dilución de biblioteca	1 tubo	4,5 ml	Solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Control interno PhiX	1 tubo	10 µl	Solución acuosa tamponada que contiene ADN genómico PhiX	Entre -25 °C y -15 °C

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx, caja 2

Tabla 5 Reactivos de posamplificación de la caja 2

Componente	Cantidad	Contenido	Almacenamiento
Cartucho de reactivo de MiSeqDx: Ensayo de secuenciación clínica de FQ	6 cartuchos	Cartucho de un solo uso que contiene reactivos para la generación y secuenciación de grupos para su uso con MiSeqDx, incluidos formamida, 2-mercaptoetanol y DMSO <2 %	Entre -25 °C y -15 °C

Abril de 2014

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15038344 Rev. A | ESP | 7

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx, caja 3

Tabla 6 Reactivos de preamplificación de la caja 3A

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

Tabla 7 Reactivos de posamplificación de la caja 3B

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Bolas de limpieza de PCR	1 tubo	5 ml	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 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales, 2-mercaptoetanol y formamida	Entre 2 °C y 8 °C
Bolas de biblioteca	1 tubo	1,2 ml	Solución acuosa tamponada que contiene bolas paramagnéticas de fase sólida	Entre 2 °C y 8 °C
Celda de flujo de MiSeqDx: Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística	6 contenedores	1 celda de flujo	Sustrato de cristal con oligonucleótidos ligados de manera covalente	Entre 2 °C y 8 °C

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx, caja 4

Tabla 8 Reactivos de posamplificación de la caja 4

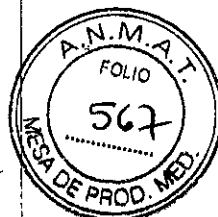
Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Solución SBS de MiSeqDx (PR2): Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística	6 botellas	353,1 ml	Solución acuosa tamponada	Entre 2 °C y 8 °C

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx, caja 5

Tabla 9 Reactivos de preamplificación de la caja 5

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Placa del filtro	6 placas	N/A	Placa de microtitulación de polipropileno con una membrana de polietersulfona modificada	Entre 15 °C y 30 °C

9442



Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Tabla 10 Reactivos de posamplificación de la caja 5

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

Reactivos necesarios no suministrados

Reactivos de preamplificación

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

Reactivos de posamplificación

- NaOH 10 N (preparación a partir de comprimidos o uso de una solución estándar)
- Etanol, 200 proof, para biología molecular
- Tampón TE
- Agua sin ARNasa ni ADNasa

Almacenamiento y manipulación

- 1 La temperatura ambiente se define como la temperatura que oscila entre 15 °C y 30 °C.
- 2 Los siguientes reactivos se suministran congelados y permanecen estables cuando se almacenan a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C hasta la fecha de caducidad especificada.
 - Grupo de oligonucleótidos del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística
 - Tampón de hibridación
 - Mezcla de extensión-ligadura
 - Cebadores de índice C (A503), D (A504) y E (A505)
 - Cebadores de índice 1 (A701), 2 (A702) y 10 (A710)
 - Polimerasa de PCR
 - Mezcla maestra de PCR
 - Diluyente de normalización de bibliotecas
 - Tampón de dilución de biblioteca
 - Control interno PhiX
 - Cartucho de reactivo de MiSeqDx: Ensayo de secuenciación clínica de FQ

Salvo en el caso del cartucho de reactivo, los reactivos permanecen estables durante un máximo de seis ciclos de congelación/descongelación antes de la fecha de caducidad especificada.

No vuelva a congelar el cartucho de reactivo una vez descongelado. Se puede almacenar hasta seis horas a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.

- 3 Los siguientes reactivos 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.
 - Tampón de lavado restrictivo
 - Tampón de lavado universal
 - Bolas de limpieza de PCR
 - Bolas de biblioteca

Abril de 2014

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15038344/Rev. A ESP | 9

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

3442



Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

- Lavado de normalización de bibliotecas
 - Solución SBS de MiSeqDx (PR2): Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística
 - Celda de flujo de MiSeqDx: Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística
- 4 Los siguientes reactivos se suministran a temperatura ambiente y permanecen estables cuando se almacenan a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad especificada.
- Tampón de elución
 - Placa del filtro
 - Tampón de almacenamiento de biblioteca
- 5 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.
- 6 Los reactivos de Tampón de hibridación, Tampón de lavado restrictivo y Diluyente de normalización de bibliotecas pueden formar precipitados o cristales visibles. Antes de su uso, agite con fuerza y, a continuación, inspeccione visualmente para garantizar que no haya precipitados.
- 7 Siga estas prácticas recomendadas para la manipulación de las Bolas de limpieza de PCR y las Bolas de biblioteca:
- No se deben congelar las bolas en ningún caso.
 - Deje que las bolas alcancen la temperatura ambiente.
 - Justo antes de su uso, agite las bolas hasta que queden bien suspendidas y se muestre un color homogéneo.
 - Mezcle bien la muestra después de añadir las bolas pipeteando arriba y abajo diez veces. Se puede utilizar un mezclador para mezclar las muestras de forma homogénea.
 - 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 se aclare. Mantenga la placa en el soporte magnético mientras aspira lentamente el sobrenadante y evite alterar las bolas apartadas.
- 8 La placa de amplificación PCR puede permanecer en el ciclador térmico durante toda la noche. También se puede almacenar a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C hasta dos días. Antes de almacenar la placa a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C, selle el pocillo de la placa.
- 9 No congele las Bolas de biblioteca ni las mezcle con el reactivo Diluyente de normalización de bibliotecas si no se van a utilizar de manera inmediata.
- 10 La placa de normalización de bibliotecas completa se puede almacenar a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C hasta tres días.
- 11 La biblioteca de amplicones agrupados se puede almacenar a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C hasta tres días.
- 12 Cargue inmediatamente el grupo de amplicón diluido recién preparado en el cartucho de reactivo. El almacenamiento del grupo de amplicón diluido puede reducir considerablemente la densidad de grupos.

Materiales y equipo

Materiales y equipo suministrados vendidos por separado

- 1 Instrumento MiSeqDx, n.º de catálogo DX-410-1001
- 2 Kit TruSeq Index Plate Fixture, n.º de catálogo FC-130-1005
- 3 Kit TruSeq Index Plate Fixture & Collar, n.º de catálogo FC-130-1007
- 4 Tapones de recambio para el adaptador de índices, n.º de catálogo DX-502-1003

10 | N.º de referencia 15038344 Rev. A ESP

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

Abril de 2014

Materiales y equipo necesarios no suministrados

Materiales y equipo de la preamplificación

- 1 **Bloque de calor:** Se precisa un bloque de calor para una placa de 96 pocillos. El bloque de calor debe cumplir con las especificaciones de rendimiento siguientes. Los bloques de calor con tapas calientes se pueden utilizar.
 - Rango de temperatura: ambiente de 5 °C a 99 °C
 - Regulación de temperatura: $\pm 0,1$ °C a 37 °C; $\pm 0,4$ °C a 60 °C
- 2 **Incubadora de muestras:** Se precisa una incubadora (horno de hibridación). La incubadora debe cumplir con las especificaciones de rendimiento siguientes:
 - Rango de temperatura: Entre 10 °C y 100 °C
 - Regulación de temperatura: $\pm 0,2$ °C
- 3 **Centrifugadora de sobremesa:** Se precisa una centrifugadora de sobremesa que pueda mantener 20 °C. (Se precisa una centrifugadora independiente en el área de posamplificación). Se admite cualquier centrifugadora de placas que alcance las velocidades indicadas del protocolo (de 280 a 2400 x g).
- 4 **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 % del volumen indicado.
- 5 **Consumibles:** Se precisan los consumibles siguientes.
 - Placas de PCR con faldones de 96 pocillos de 0,2 ml de polipropileno o equivalente
NOTA: Asegúrese de que la placa de 96 pocillos sea compatible con el soporte magnético.
 - Placas de almacenamiento de 96 pocillos de 0,8 ml (placas MIDI)
 - Recipiente de solución de PVC sin ADNasa ni ARNasa (cubeta)
 - Sello de película de aluminio adhesiva
 - Sello para placas de PCR adecuado
 - Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles

Materiales y equipo de la posamplificación

- 1 **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: Entre 4 °C y 99 °C
 - Precisión de control: $\pm 0,25$ °C de 35 °C a 99 °C
- 2 **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 rpm
 - Rango de velocidad de mezcla: de 200 a 3000 rpm
- 3 **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 x g).
- 4 **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: ambiente de 5 °C a 99 °C
 - Regulación de temperatura: $\pm 0,1$ °C a 37 °C; $\pm 0,4$ °C a 60 °C
- 5 **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.
- 6 **Pipetas de precisión:** Se precisa un conjunto de pipetas de precisión. (Se precisa un conjunto independiente en el área de preamplificación). Se precisa el uso de pipetas de precisión para garantizar la administración

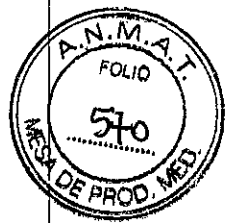
Abril de 2014

Lic. Alejandro Díez
 Apoderado
 BioSystems S.A.

N.º de referencia 15029344 Rev. A ESP | 11

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

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 % del volumen indicado.

7 **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
- Tubos de microcentrífuga Eppendorf (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 para placas
- Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles

Recopilación, transporte y almacenamiento de muestras



NOTA

Manipule todas las muestras como si fueran agentes potencialmente infecciosos.

- 1 Se pueden utilizar muestras de sangre total recogidas en tubos EDTA K₂.
- 2 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.
- 3 Es posible transportar sangre total durante un máximo de siete días a temperatura ambiente, 30 días a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C o 30 días congelada 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.
- 4 No se han observado efectos adversos en el rendimiento del ensayo al someter el ADN genómico a seis ciclos de congelación y descongelación.
- 5 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.

- 1 Algunos componentes de este ensayo contienen formamida, una amida alifática que es una toxina reproductiva probable. (Consulte *Reactivos* en la página 7 para obtener más información). Evite su inhalación o ingestión, o el contacto con la piel o los ojos, pues podrían producirse lesiones. Deseche los contenedores y los contenidos no utilizados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona. Para obtener más información, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
- 2 Algunos componentes de este ensayo contienen 2-mercaptoetanol, un agente reductor. (Consulte *Reactivos* en la página 7 para obtener más información). Evite su inhalación o ingestión, o el contacto con la piel o los ojos, pues podrían producirse 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, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
- 3 Manipule todas las muestras como si fueran agentes potencialmente infecciosos.

12 N.º de referencia 15038344 Rev. A ESP

Lic. Alejandro Díez
 Apoderado
 BioSystems S.A.

Abil de 2014
 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeq

- 4 El incumplimiento de los procedimientos descritos puede provocar resultados erróneos o una reducción considerable de la calidad de las muestras.
- 5 Tenga en cuenta las precauciones habituales 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.
- 6 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. Tenga en cuenta que los lotes de ensayo se identifican con la etiqueta de la caja del ensayo.
- 7 Almacene los componentes del ensayo a la temperatura especificada en las áreas de preamplificación y posamplificación designadas.
- 8 Los ciclos de congelación y descongelación repetidos (hasta seis) de los componentes de la caja 1 no afectarán a la integridad del ensayo.
- 9 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.
- 10 Se precisa seguir 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 arrojar resultados poco precisos y fiables.
- 11 Para evitar la contaminación, asegúrese de que las áreas de preamplificación y posamplificación dispongan de equipos especializados (tales como pipetas, puntas de pipetas, mezcladores vorticiales y centrifugadoras).
- 12 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 de restos de amplicones y de contaminación cruzada entre muestras.
- 13 El emparejamiento de muestras de índice debe coincidir exactamente con la hoja de muestras. Las incoherencias entre la hoja de muestras y la disposición de placas provocará la pérdida de identificación de muestras positivas y la generación de informes con resultados incorrectos.
- 14 Para el procedimiento de lavado, prepare siempre una solución nueva con etanol al 80 %. El etanol puede absorber agua del aire y afectar a los resultados.
- 15 Asegúrese siempre de eliminar el etanol del fondo de los pocillos durante el procedimiento de lavado. Los restos de etanol pueden afectar a los resultados.
- 16 Cumpla el tiempo de secado especificado siguiendo el paso relativo al soporte magnético para garantizar una evaporación completa. Los restos de etanol pueden afectar al rendimiento de las reacciones posteriores.
- 17 No mezcle Grupo de oligonucleótidos del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística y Tampon de hibridación para el almacenamiento. Al combinarse, el Grupo de oligonucleótidos del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística se vuelve inestable incluso si se almacena congelado.
- 18 No se recomienda 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.
- 19 Añada siempre Polimerasa de PCR a la Mezcla maestra de PCR justo antes de su uso. Nunca almacene la solución de trabajo combinada.
- 20 Durante el paso de normalización de bibliotecas, es muy importante resuspender por completo el pellet de las bolas de la biblioteca. Esto resulta fundamental para lograr una densidad de grupos homogénea en la celda de flujo de MiSeqDx.
- 21 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.
- 22 Debido al número de transferencias de placas y al potencial de contaminación consiguiente, se debe prestar especial atención para garantizar que el contenido de los pocillos permanezca completamente en el pocillo. Evite las salpicaduras de contenido.

Abril de 2014

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15038344 Rev. A ESP | 13

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

- 23 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.

Notas del procedimiento

- 1 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 salvaje. El control salvaje se debe procesar como muestra y no debe sustituir al control positivo o negativo.
- 2 Antes de iniciar el Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx, extraiga y cuantifique el ADN.
- 3 Se puede utilizar cualquier método de extracción de ADN validado.
- 4 Cuantifique el ADN con un espectrómetro. Verifique que A260/A280 de la muestra de ADN sea superior a 1,5. Normalice la muestra de ADN a 50 ng/μl. Cada muestra requiere 5 μl de ADN genómico (total de 250 ng).

Producción de muestras y representación de índices

Para el Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx de Illumina, la producción de muestras por experimento de MiSeqDx es de ocho muestras. Los cebadores de índice utilizados durante la amplificación PCR se deben elegir en función del rendimiento final de muestras que se desee con el fin de garantizar la diversidad de la secuencia de índice.

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

Utilice el siguiente conjunto mínimo de índices con equilibrio de color para los experimentos de secuenciación de ocho muestras:

Tabla 11 Combinaciones de cebadores de índice para experimentos de secuenciación de ocho muestras

	Cebador de índice 1 (A701)	Cebador de índice 2 (A702)	Cebador de índice 10. (A710)
Cebador de índice C (A503)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Cebador de índice D (A504)	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
Cebador de índice E (A505)	Muestra 7	Muestra 8	--

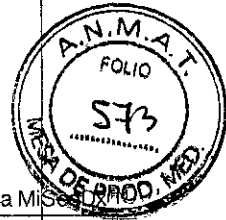
Si no se dispone de seis muestras únicas (excluidos los controles positivos y negativos), es aceptable llenar el experimento con duplicados de cualquier muestra de ADN genómico humano.

Instrucciones de uso

Preparación de la hoja de muestras de MiSeqDx

- 1 En la pantalla Welcome (Bienvenida) del Gestor de la lista de trabajos de Illumina (IWM), seleccione **Create Worklist** (Crear lista de trabajo).
- 2 En el campo Test Type (Tipo de prueba), seleccione **Ensayo de secuenciación clínica de FQ**.
- 3 En el campo Worklist Name (Nombre de la lista de trabajo), introduzca un nombre para la hoja de muestras.

9442



Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeq

- Si se usa el ID alfanumérico del código de barras del cartucho de reactivo para el nombre de la hoja de muestras, Software operativo de MiSeq (MOS) encontrará la hoja de muestras automáticamente.
 - Si se asigna otro nombre a la hoja de muestras, se puede usar el botón **Browse** (Examinar) de Software operativo de MiSeq (MOS) para localizar la hoja de muestras correspondiente.
- 4 [Opcional] Escriba una descripción para identificar el experimento.
 - 5 Asegúrese de que la fecha coincida con la fecha de inicio del experimento.
 - 6 Seleccione **Next** (Siguiente).

Introducción de información de la muestra

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

Hibridación de grupo de oligonucleótidos

Preparación

- 1 Deje que el Grupo de oligonucleótidos del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística, el Tampón de hibridación, las muestras de ADN genómico y la muestra de control positivo alcancen la temperatura ambiente.
- 2 Agite el Grupo de oligonucleótidos del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística y el Tampón de hibridación con fuerza para asegurarse de que todos los precipitados se hayan disuelto por completo y, a continuación, centrifugue brevemente los tubos para recoger el líquido.
- 3 Caliente un bloque de calor de 96 pocillos a 95 °C.
- 4 Precaliente una incubadora a 37 °C.
- 5 Cree la placa de muestras de acuerdo con el gráfico de placa impreso con el IWM.

Procedimiento

- 1 Disponga una nueva placa de PCR de 96 pocillos (en adelante, placa **HYB**).
- 2 Añada 5 µl de muestra o control a 50 ng/µl (250 ng total) en los pocillos correspondientes de la placa **HYB**. Siga la disposición de placas generada para una selección correcta de los pocillos.
- 3 Añada 5 µl de Grupo de oligonucleótidos del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística en todos los pocillos que contienen ADN genómico.
- 4 Añada 40 µl de Tampón de hibridación en cada muestra de la placa **HYB**. Pipetee con cuidado arriba y abajo entre tres y cinco veces para mezclar.
- 5 Selle la placa **HYB** y centrifugue a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- 6 Coloque la placa **HYB** en el bloque precalentado a 95 °C e incúbela durante un minuto.
- 7 Reduzca la temperatura del bloque de calor a 40 °C y sígalo incubando hasta que alcance los 40 °C (aproximadamente, unos 80 minutos).

Para una hibridación adecuada es fundamental una refrigeración gradual; por lo tanto, no se recomiendan los cicladores térmicos para PCR con refrigeración activa (por ejemplo, efecto Peltier o refrigeración termoeléctrica) para este proceso.

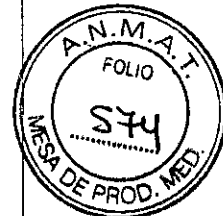
Abril de 2014

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 190383 Rev. A ESP | 15

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

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

Eliminación de oligonucleótidos sin ligar

Preparación

- 1 Deje que la Mezcla de extensión-ligadura, el Tampón de lavado restrictivo y el Tampón de lavado universal alcancen la temperatura ambiente y, a continuación, agite brevemente.
- 2 Monte el conjunto de la unidad de la placa del filtro (en adelante, **FPU**) desde la parte superior hasta la parte inferior: tapa, placa del filtro, collar adaptador y 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.

Procedimiento

- 1 Retire la placa **HYB** del bloque de calor y centrifugue a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- 2 Transfiera el volumen íntegro (aproximadamente 55 µl) 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 Repita el lavado tal y como se describe en el paso anterior.



NOTA

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 (unos cinco o diez minutos adicionales).

- 6 Deseche todo el flujo (que contiene formamida) recogido hasta este punto y, a continuación, vuelva a montar la **FPU**.
- 7 Añada 45 µl de Tampón de lavado universal en cada pocillo de muestra.
- 8 Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a 2400 × g a 20 °C durante diez minutos.



NOTA

Asegúrese de que se haya drenado todo el líquido tras el centrifugado. Repita el centrifugado en caso necesario.

Extensión-ligadura de oligonucleótidos ligados

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 con película de aluminio adhesiva y, a continuación, cúbrala con la tapa.
- 3 Incube la **FPU** en la incubadora precalentada a 37 °C durante 45 minutos.

Amplificación PCR

Preparación

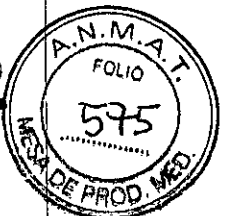
- 1 Prepare NaOH 0,05 N nuevo.
- 2 Determine los cebadores de índice que se deben utilizar de acuerdo con la impresión del gráfico de la placa del Gestor de la lista de trabajos de Illumina.
- 3 Deje que la Mezcla maestra de PCR y los cebadores de índice adecuados alcancen la temperatura ambiente. Agite cada tubo descongelado para mezclarlo y, a continuación, centrifugue brevemente los tubos.

N.º de referencia 15038344 Rev. A ESP

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

Abril de 2014
Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

- 4 Disponga una nueva placa de PCR de 96 pocillos (en adelante, placa AMP).
- 5 Añada cebadores de índice a la placa AMP de acuerdo con la hoja de muestras siguiente:
 - a Añada 4 µl de cebadores de índice C (A503), D (A504) y E (A505) a los pocillos correspondientes en una columna de la placa AMP.
 - b Deseche los tapones blancos originales y coloque tapones blancos nuevos.
 - c Añada 4 µl de cebadores de índice seleccionados 1 (A701), 2 (A702) y 10 (A710) a los pocillos correspondientes en una fila de la placa AMP. *Se deben cambiar las puntas después de cada fila para evitar la contaminación cruzada entre índices.*
 - d Deseche los tapones naranjas originales y coloque tapones naranjas nuevos.
- 6 Prepare la solución de trabajo de PCR de Mezcla maestra de PCR/Polimerasa de PCR tal y como se indica a continuación:
 - a Añada 5,6 µl de Polimerasa de PCR a 280 µl de Mezcla maestra de PCR.
 - b Invierta la solución de trabajo de PCR preparada 20 veces para mezclarla.

Procedimiento

- 1 Retire la FPU de la incubadora y, a continuación, retire el sello de película de aluminio.
- 2 Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a $2400 \times g$ a 20°C durante dos minutos.
- 3 Añada 25 µl de NaOH 0,05 N en cada pocillo de muestra en la placa del filtro. Pipetee NaOH arriba y abajo cinco o seis veces.
- 4 Cubra e incube la placa del filtro a temperatura ambiente durante cinco minutos.
- 5 Mientras la placa del filtro se incuba, transfiera 22 µl de la solución de trabajo de PCR a cada pocillo de la placa AMP que contiene cebadores de índice.
- 6 Transfiera muestras eluidas desde el filtro hasta la placa AMP como se indica a continuación:
 - a Pipetee las muestras en la primera columna de la placa del filtro arriba y abajo cinco o seis veces.
 - b Transfiera 20 µl desde la placa del filtro a la columna correspondiente de la placa AMP.
 - c Pipetee con cuidado arriba y abajo cinco o seis veces para combinar bien el ADN con la solución de trabajo de PCR.
 - d Transfiera las columnas restantes desde la placa del filtro a la placa AMP de una manera similar. *Se deben cambiar las puntas después de cada columna para evitar la contaminación cruzada entre índices y muestras.*
- 7 Selle la placa AMP y asegúrela con un rodillo de goma.
- 8 Centrifugue a $1000 \times g$ a 20°C durante un minuto.
- 9 Transfiera la placa AMP al área de posamplificación.
- 10 Realice el proceso de PCR siguiendo este programa en un ciclador térmico:
 - 95°C durante 3 minutos
 - 25 ciclos de:
 - 95°C durante 30 segundos
 - 62°C durante 30 segundos
 - 72°C durante 60 segundos
 - 72°C durante 5 minutos
 - Mantenga la temperatura a 10°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°C a 8°C hasta 48 horas.

Limpieza de PCR

Preparación

- 1 Deje que Bolas de limpieza de PCR alcance la temperatura ambiente.

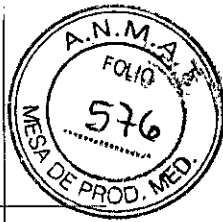
Abril de 2014

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 16038324 Rev. A ESP | 17

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



- 2 Prepare una solución nueva con etanol al 80 % a partir de una solución de etanol absoluta.

Procedimiento

- 1 Centrifugue la placa AMP a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- 2 Disponga una nueva placa MIDI (en adelante, placa CLP).
- 3 Invierta las Bolas de limpieza de PCR 10 veces. Agite con vigor 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 la placa AMP a la placa CLP.
- 6 Selle la placa CLP y agítela en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante dos minutos.
- 7 Incube a temperatura ambiente sin agitar durante 10 minutos.
- 8 Coloque la placa en un soporte magnético durante un mínimo de dos minutos o hasta que el sobrenadante se distinga con claridad.
- 9 Con la placa CLP en el soporte magnético, extraiga y deseche con cuidado el sobrenadante.
- 10 Con la placa CLP en el soporte magnético, lave las bolas tal y como se indica a continuación:
 - a Añada 200 µl de etanol al 80 % recién preparado en cada pocillo de muestra.
 - b Incube la placa en el soporte magnético durante un mínimo de 30 segundos o hasta que el sobrenadante se distinga con claridad.
 - c Extraiga y deseche con cuidado el sobrenadante.
- 11 Repita el lavado tal y como se describe en el paso anterior.
- 12 Utilice una pipeta multicanal P20 con configuración de pipeteo a 20 µl para extraer el exceso de etanol.
- 13 Retire la placa CLP del soporte magnético y deje secar las bolas durante 10 minutos.
- 14 Añada 30 µl de Tampón de elución en cada muestra y, a continuación, agite brevemente.
- 15 Selle la placa CLP y agítela en un agitador de microplacas a 1800 rpm 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 CLP en el soporte magnético durante un mínimo de dos minutos o hasta que el sobrenadante se distinga con claridad.
- 18 Disponga una nueva placa MIDI (en adelante, placa LNP).
- 19 Transfiera 20 µl del sobrenadante de la placa CLP a la placa LNP.
- 20 [Opcional] Transfiera los 10 µl de sobrenadante restante de la placa CLP a una nueva placa y asigne una etiqueta a la placa que incluya un nombre de experimento y la fecha. 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 de bibliotecas

Preparación

- 1 Prepare NaOH 0,1 N nuevo.
- 2 Deje que el Diluyente de normalización de bibliotecas, las Bolas de biblioteca y el Lavado de normalización de bibliotecas alcancen la temperatura ambiente.
- 3 Agite el Diluyente de normalización de bibliotecas con vigor y asegúrese de que todos los precipitados se hayan disuelto por completo.
- 4 Agite las Bolas de biblioteca con vigor durante un minuto invirtiéndolas de manera intermitente hasta que las bolas se resuspendan y no quede pellet en el fondo del tubo cuando este se invierte.

18 | N.º de referencia 15038344 Rev. A ESP

Lic. Alejandro Díez
V. Apoderado
BioSystems S.A.

Abril de 2014

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

Procedimiento

- 1 Mezcle el Diluyente de normalización de bibliotecas y las Bolas de biblioteca en un tubo nuevo de 1,5 ml como se indica a continuación:
 - a Añada 394 μ l de Diluyente de normalización de bibliotecas.
 - b Pipetee las Bolas de biblioteca arriba y abajo 10 veces para resuspender.
- NOTA**
 Resulta muy importante resuspender completamente el pellet de las bolas de la biblioteca del fondo del tubo. Si utiliza una P1000, se asegurará de que las bolas queden resuspendidas de manera homogénea y de que no quede masa de bolas en el fondo del tubo. Esto resulta fundamental para lograr una densidad de grupos homogénea en la celda de flujo.
- c Pipetee 72 μ l de Bolas de biblioteca en el tubo que contiene Diluyente de normalización de bibliotecas.
 - d Dé la vuelta al tubo entre 15 y 20 veces para mezclar el contenido.
- 2 Añada 45 μ l de la solución de trabajo de Diluyente de normalización de bibliotecas/Bolas de biblioteca combinada en cada pocillo de la placa LNP que contiene bibliotecas.
 - 3 Selle la placa LNP y agítela en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante 30 minutos.
 - 4 Coloque la placa en un soporte magnético durante un mínimo de dos minutos o hasta que el sobrenadante se distinga con claridad.
 - 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 el 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 rpm durante cinco 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 en cada pocillo.
 - 10 Selle la placa LNP y agítela en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante cinco minutos.
 - 11 Durante los cinco minutos de elución, disponga una nueva placa de PCR de 96 pocillos (en adelante, placa SGP).
 - 12 Añada 30 μ l de Tampón de almacenamiento de biblioteca a cada pocillo que se debe utilizar en la placa SGP.
 - 13 Tras la elución de cinco minutos, 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 para resuspender las bolas y, a continuación, agite cinco minutos más.
 - 14 Coloque la placa LNP en el soporte magnético durante un mínimo de dos minutos.
 - 15 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 20 °C durante un minuto.



PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si no se procede de manera inmediata a la agrupación de bibliotecas y la consiguiente secuenciación en MiSeqDx, almacene la placa SGP sellada a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C hasta tres días.

Abril de 2014

Lic. Alejandro Díez
 Argenteo
 BioSystems S.A.

N.º de referencia 150383 Rev. A ESP | 19

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

Agrupación de bibliotecas

Preparación para agrupación de bibliotecas

- 1 Caliente un bloque de calor apto para tubos de centrifuga de 1,5 ml a 96 °C.
- 2 En una hielera, prepare un baño de agua con hielo. Enfíe el Tampón de dilución de biblioteca en el baño de agua con hielo.
- 3 Empiece a descongelar el cartucho de reactivo de MiSeqDx.

Preparación de una dilución nueva de NaOH



PRECAUCIÓN

El uso de una solución nueva de NaOH diluida es esencial para desnaturalizar completamente las muestras para la generación de grupos en MiSeqDx.

- 1 Combine los volúmenes siguientes en un tubo de microcentrifuga:
 - Agua sin ARNasa ni ADNasa (900 µl)
 - Preparado de NaOH 1,0 N (100 µl)
- 2 Invierta el tubo varias veces para mezclar.

Desnaturalización y dilución de Control interno PhiX

- 1 Combine los siguientes volúmenes para diluir la biblioteca de Control interno PhiX a 2 nM:
 - Biblioteca de Control interno PhiX de 10 nM (2 µl)
 - 1 tampón TE (8 µl)
- 2 Combine los siguientes volúmenes para que dé como resultado una biblioteca de Control interno PhiX de 1 nM:
 - Biblioteca de Control interno PhiX de 2 nM (10 µl)
 - NaOH 0,1 N (10 µl)
- 3 Agite brevemente para mezclar la solución de la biblioteca de Control interno PhiX de 1 nM.
- 4 Centrifugue la solución de plantilla a 280 × g a 20 °C durante un minuto.
- 5 Incúbela durante 4,5 minutos a temperatura ambiente para desnaturalizar la biblioteca de Control interno PhiX en cadenas individuales.
- 6 Añada el siguiente volumen de Tampón de dilución de biblioteca previamente refrigerado en el tubo que contiene la biblioteca de Control interno PhiX desnaturalizada para obtener una biblioteca de Control interno PhiX de 20 pM.
 - Biblioteca de Control interno PhiX desnaturalizada (20 µl)
 - Tampón de dilución de biblioteca enfriado previamente (980 µl)

Preparación del cartucho de reactivo

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

Inspección del cartucho de reactivo

- 1 Invierta el cartucho de reactivo diez veces para mezclar los reactivos descongelados y, a continuación, compruebe visualmente que todas las posiciones estén descongeladas.

**NOTA**

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

- 2 Inspeccione visualmente el reactivo de la posición 1 para asegurarse de que se haya mezclado completamente y no presente precipitados.
- 3 Golpee suavemente el cartucho en la mesa para reducir las burbujas de aire en los reactivos.

**NOTA**

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

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

Preparación de muestras para secuenciación

- 1 Deje que el Tampón de dilución de biblioteca alcance la temperatura ambiente. Agite el Tampón de dilución de biblioteca y asegúrese de que todos los precipitados se hayan disuelto por completo.
- 2 Si la placa **SGP** se ha almacenado congelada, descongéla a temperatura ambiente.
- 3 Centrifugue la placa **SGP** a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- 4 Disponga un tubo Eppendorf nuevo (en adelante, tubo **PAL**).
- 5 Si la placa **SGP** se ha almacenado congelada, mezcle cada biblioteca que se deba secuenciar pipeteando arriba y abajo entre tres y cinco veces.
- 6 Transfiera 5 µl de cada biblioteca que se deba secuenciar de la placa **SGP** a una gradilla de ocho tubos de PCR. Selle la placa **SGP** con un sello adhesivo para placas y resérvela.

**NOTA**

Tras su uso, almacene la placa **SGP** sellada a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C. La placa **SGP** sellada permanece estable hasta tres días.

- 7 Combine y transfiera el contenido de la gradilla de ocho tubos de PCR al tubo **PAL**. Mezcle bien el tubo **PAL** agitándolo.
- 8 Disponga un tubo Eppendorf nuevo (en adelante, tubo **DAL**).
- 9 Añada 585 µl de Tampón de dilución de biblioteca en el tubo **DAL**.
- 10 Añada 6 µl de 20 pM de Control interno PhiX en el tubo **DAL**. Pipetee arriba y abajo entre tres y cinco veces para enjuagar la punta y garantizar una transferencia completa.
- 11 Transfiera 9 µl de **PAL** al tubo **DAL** que contiene Tampón de dilución de biblioteca. Pipetee arriba y abajo entre tres y cinco veces para enjuagar la punta y garantizar una transferencia completa.
- 12 Mezcle la **DAL** agitando el tubo tan rápido como pueda.
- 13 Centrifugue el tubo **DAL** a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- 14 Incube el tubo **DAL** en un bloque de calor a 96 °C durante dos minutos.
- 15 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.
- 16 Mantenga el tubo **DAL** en el baño de agua con hielo durante cinco minutos.

Carga de bibliotecas de muestras en cartuchos

- 1 Utilice una punta de pipeta de 1 ml independiente, limpia y vacía para perforar el sello metálico situado por encima del depósito del cartucho de reactivo etiquetado como **Load Samples** (Carga de muestras).
- 2 Pipetee 600 µl de las bibliotecas de muestra en el depósito **Load Samples** (Carga de muestras). Proceda con cuidado para evitar tocar el sello metálico al dispensar la muestra.
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.

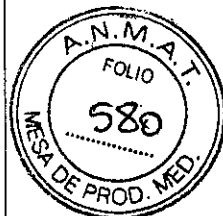
Abril de 2014

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15038344 Rev A ESP | 21

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



- 3 Continúe directamente con los pasos de configuración del experimento con la interfaz de Software operativo de MiSeq (MOS).

Interpretación de resultados

El Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx de Illumina se ha diseñado para secuenciar todas las regiones de codificación de proteínas 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 y 3489+10kbC>T). Las regiones exactas secuenciadas se enumeran en la Tabla 2. 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 deleción/inserción (DIV), variante Poli-TG/Poli-T (Poli-TG/Poli-T) o deleción 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 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 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 encuentran en lo que se valida en el estudio de precisión (consulte *Precisión* en la página 24) 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.¹¹ Entre las posibles referencias de interpretación se incluyen, entre otras, las siguientes: la base de datos del CFTR^{12, 13}, el artículo de Sosnay¹⁰, las directrices de la ACMG de 2004¹⁴ y la opinión del comité ACOG de 2011.⁸
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 *Guía del usuario de MiSeq Reporter* (n.º de referencia 15038356_ESP).

9442



- 6 El especialista en genética puede utilizar el software MiSeq Reporter para introducir un valor de interpretación correspondiente a cada variante notificada en una muestra con un menú desplegable. Las opciones de los valores de interpretación son las siguientes: variante causante de la fibrosis quística, mutación de consecuencia clínica variable, mutación de relevancia desconocida o variante que no causa 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.

- 1 **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 CFTR¹⁵ conocida. 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 quística¹⁶ y las normativas de los laboratorios clínicos de 2013 de la ACMG para la secuenciación de próxima generación.¹⁷ 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 todo el ensayo desde la preparación de bibliotecas.
- 2 **Control negativo (sin muestra/sin ADN):** Se requiere el uso de un control negativo (sin muestra/sin ADN) 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 %, es posible que se haya producido contaminación durante el procesamiento del ensayo. El ensayo se considera erróneo y, por lo tanto, se debe repetir todo el ensayo desde la preparación de bibliotecas.
- 3 **Control salvaje:** Se recomienda una muestra de control de ADN salvaje en cada experimento. La muestra de control salvaje debe ser una muestra con características bien definidas que no contenga ninguna variante de CFTR. La muestra de control salvaje 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 todo el ensayo desde la preparación de bibliotecas.
- 4 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.
- 5 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.

Abril de 2014

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15038344 Rev. A ESP | 23

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Díez
Asesor de
Biosystems S.A.

Características de rendimiento

Precisión

La precisión del Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx de Illumina 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 muestras (n = 355) eran muestras clínicas de ADN 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.

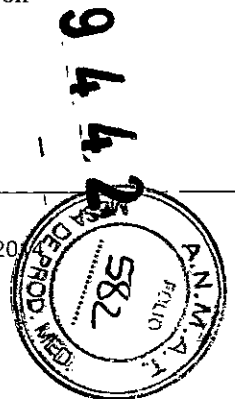
Para el Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx, se compararon un total de 5206 posiciones con los métodos de referencia de secuenciación bidireccional de Sanger y las pruebas de PCR. Los resultados de genotipado correspondientes a las posiciones de inserción y deleción de pequeño 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 salvajes 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. Se calculó la coincidencia total 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, según se identificó con los métodos de referencia.

El Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx arrojó una coincidencia positiva en el nivel del genotipo del 99,66 %, incluidas las variantes Poli-TG/Poli-T, y del 100 %, sin incluir 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 %.

Dra. SILVINA ZANELLA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.1421
BIOSYSTEMS S.A.



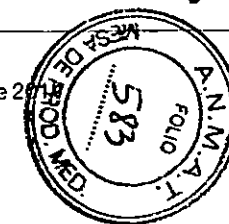
Leopoldo Díaz
 Apodado
 Biosystems S.A.

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Tabla 12 Precisión total del Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx

Genotipo (nombre común/nombre de ADN/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
394delIT	c.262_263 delIT	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

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



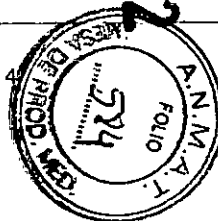
9662

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Lic. Alejandro Díez
 Responsable
 Biosystems S.A.

Genotipo (nombre común/nombre de ADN/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			
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
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

Dra. SILVINA ZANELLA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



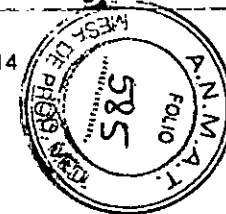
9642

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Dr. Alejandro Díez
 Apoderado
 Biosystems S.A.

Genotipo (nombre común/nombre de ADN/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			
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+5G>A	c.579+5G>A	SNV	Intrón 5	0	0	1	0	0	100
712-1G>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
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

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN. 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



9442

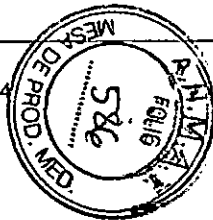
Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Lic. Meléndez
Abogado
Biosystems S.A.

Genotipo (nombre común/nombre de ADN/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			
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

9642

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

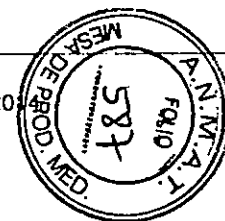


Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Genotipo (nombre común/nombre de ADN/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			
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
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

Lic. Alejandro Díez
Apodado
Biosystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



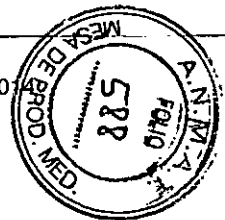
9642

Lic. Alejandro Díez
 Responsable
 Biosystems S.A.

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Genotipo (nombre común/nombre de ADN/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			
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
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

Dra. SKYINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



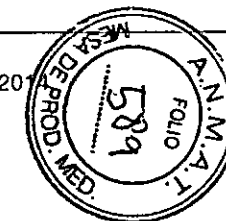
9442

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

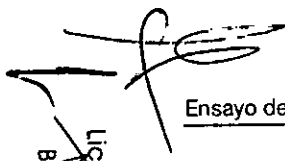
Lic. Alejandro Díez
Abogado
Biosystems S.A.

Genotipo (nombre común/nombre de ADN/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			
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
P574H	c.1721C>A	SNV	Exón 13	0	1	0	0	0	100

Dra SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



9442



Lic. Alejandro Díez
 Responsable
 Biosystems S.A.

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

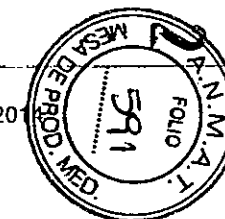
Genotipo (nombre común/nombre de ADN/coordenada)	Nombre de ADNc	Tipo de variante	Región del gen CFTR (hg19)	Llamadas positivas (variantes)			Ausencia de llamadas*	Llamadas incorrectas	Coincidencia positiva
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas			
G576A	c.1727G>C	SNV	Exón 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

2142

Dra. SILVIA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.




Genotipo (nombre común/nombre de ADN/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			
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
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

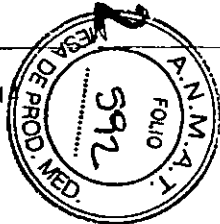


Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Dr. Alejandro Díez
Apodado
Biosystems S.A.

Genotipo (nombre común/nombre de ADN/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			
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
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

Dr. SILVINA ZANELLA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



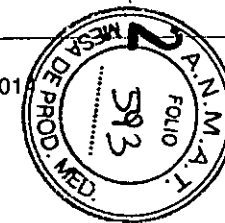
9442

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Lic. Alejandra Biez
Apodado
BioSystems S.A.

Genotipo (nombre común/nombre de ADN/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			
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	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

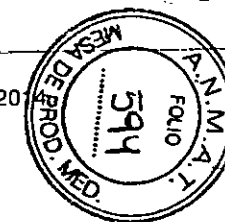
Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



9442

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Genotipo (nombre común/nombre de ADN/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			
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
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



21642

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			
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
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

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Lic. Alejandro Díez
 Absoderado
 Biosystems S.A.

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			
Total de todas las variantes (coincidencia positiva)†				2072			3	4	99,66
Total de todas las cepas salvajes (coincidencia negativa)				2 600 928			1	2‡	>99,99
Total de todas las cepas salvajes y variantes (coincidencia total)				260 3000			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 todas 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.

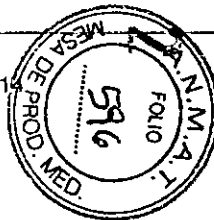
‡ La coincidencia positiva excluidas las llamadas de Poli-TG/Poli-T fue del 100 %.

§ Se notificó una muestra heterocigótica sintética para el exón 8 como heterocigótica en el caso de la variante dele22, 23 de CFTR. Investigaciones adicionales revelaron que este resultado se debía, posiblemente, a una contaminación de bajo nivel. 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 13 Precisión de la variante Poli-TG/Poli-T para el Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx

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 ausencia de llamadas*	% de 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
(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

DRA. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN. 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



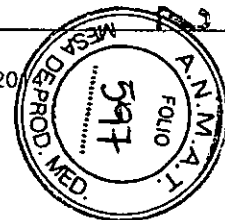
9 4 6

Lic. Alejandro Díaz
 Responsable
 Biosystems S.A.

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

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 ausencia de llamadas*	% de precisión
(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

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



9442

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

- * 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 todas las 18 duplicaciones, pero no concordaba con la secuenciación bidireccional de Sanger.

Reproducibilidad

La reproducibilidad del sistema de fibrosis quística MiSeqDx 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 ADNg que sirve como entrada principal del flujo de trabajo de ensayo.

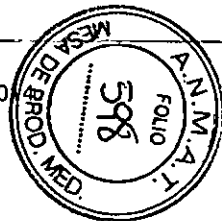
El índice de muestra de paso, definido como el número de muestras que superan los criterios de control de calidad en el primer intento, fue del 99,7 %. Todos los resultados se basan en la prueba inicial.

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 14. Reproducibilidad del Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx (excluidas 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 ^e	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

9662



Lic. Alejandro Díez
 Apodado
 Biosystems S.A.

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

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 ^c	Llamadas incorrectas	
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
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

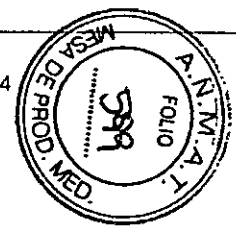
9442

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

[Handwritten signature]

N.º de referencia 15038344 Rev. A ESP

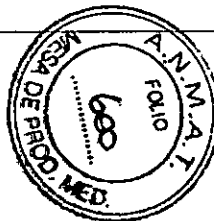
Abril de 2014



Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

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 ^c	Llamadas incorrectas	
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

94,44

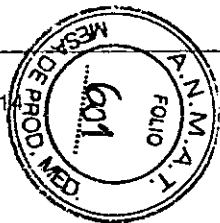


Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Dr. Alejandro Diez
 Apoderado
 Biosystems S.A.

Muestra	Nombre de la HGVS (o ubicación sin HGVS)	Nombre de la variante	Resultados totales		Llamadas coincidentes			Total (todós 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

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TECNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

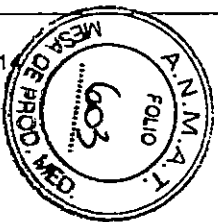


9.4.4.2

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 ^c	Llamadas incorrectas	
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
15	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

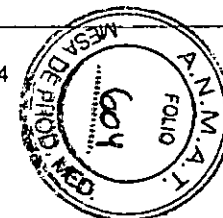
Muestra	Nombre de la HGVS (o ubicación sin HGVS)	Nombre de la variante	Resultados totales		Llamadas coincidentes			Total (todos los centros)		% de coincidencia
			Por centro	Todos los centros	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Ausencia de llamadas ^c	Llamadas incorrectas	
17, 41	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	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

9442



Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

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 ^c	Llamadas incorrectas	
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
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

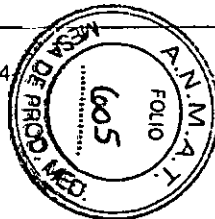


9442

Lic. Alejandro Díez
Aboderado,
BioSystems S.A.

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	
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
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

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



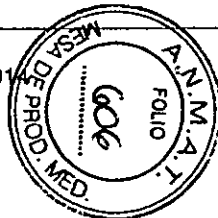
9442

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

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.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

Ugo Alejandro Díez
Apoderado
Biosystems S.A.

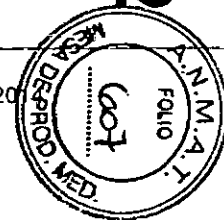
Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



9442

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

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	
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
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



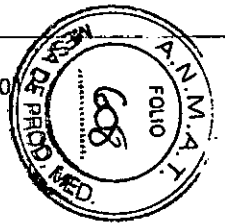
9442

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Dr. Alejandro Díez
Apodado
Biosystems S.A.

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 ^c	Llamadas incorrectas	
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

Dr. SILVINA ZANELLA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



90662

Biosystems S.A.

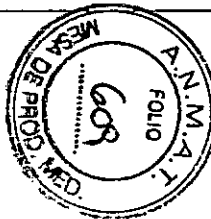
Dr. Alejandro D'hez
Apodado

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

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	
53, 90	c.3773_3774insT	3905insT	12	36	12	12	12	0	0	100
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

9442

Dra. SILVINA ZANELLA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

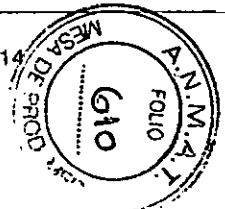


Ue Alejandro Diez
 Vaboderro
 Biosystems S.A.

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

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	
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
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

Dra. SILVINA ZANELLA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



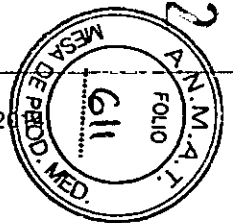
9442

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Lic. **Mejorino Diez**
 Apodada
 Biosystems S.A.

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	
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

Dra. **SILVINA ZANELA**
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



61662

Alfonso Diez
Apoderado
Biosystems S.A.

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

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	
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
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

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



7.7.7.8

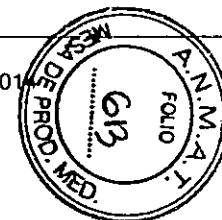
Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

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	
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
77	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100

9442

DRª SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN. 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

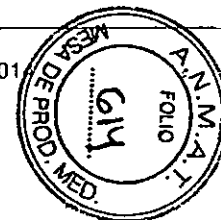


Lic. Alejandro Diez
 Apodado
 Biosystems S.A.

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

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	
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-T>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	11712014I	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

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



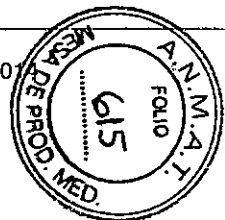
9442

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Lic. Alejandro Biez
 Apodado
 Biosystems S.A.

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 ^c	Llamadas incorrectas	
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
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

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



9442

Lic. Alejandro Biez
 Cabodensó
 Biosystems S.A.

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

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 ^c	Llamadas incorrectas	
84	c4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
Total de todas las variantes (coincidencia positiva)** (incluidos los datos de Poli-TG/Poli-T en la Tabla 15)			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

^c No se volvieron a comprobar las muestras.

^a 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.

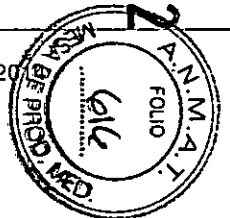
* Tras su revisión, se comprueba que el operador ha podido alternar las muestras 9 y 10 antes de la preparación de bibliotecas.

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

Tabla 15 Reproducibilidad de Poli-TG/Poli-T para el Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx

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 %

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14421
 BIOSYSTEMS S.A.



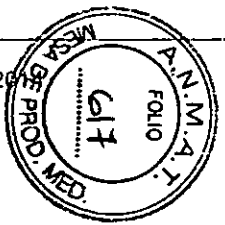
9442

Lic. Alejandro Diez
 Aboderado
 Biosystems S.A.

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

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 %

Dra. SILVINA ZANELLA
 DIRECTORA TECNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



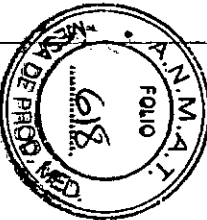
2016

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Lic. Alejandro Díez
 Abodada
 BIOSYSTEMS S.A.

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	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 %
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 %

Dra. BILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



946

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

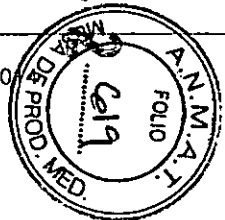
Lic. Alejandro Díez
Abodador
Biosystems S.A.

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	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 %
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 %

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

N.º de referencia 15038344 Rev. A ESP

Abril de 20

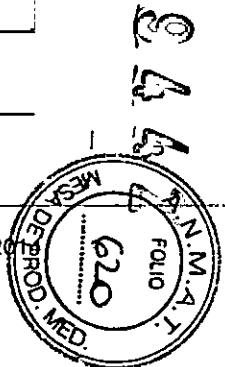


9446

Lic. Alejandro Diez
 Goddardo
 Biosystems S.A.

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	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 %

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14 421
 BIOSYSTEMS S.A.



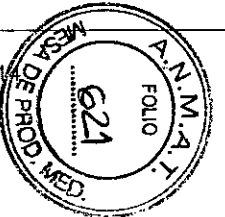
3467

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

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

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELLA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



9442

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 ADN_g extraídas se determinaron mediante espectrometría. El tamaño de las muestras total para cada método de extracción de este estudio fue de 168 (14 muestras x 2 operadores/método de extracción x 3 experimentos/operador x 2 duplicados/muestra de ADN_g extraída).

Método de extracción	Número de muestras analizadas	Índice de llamada	Precisión	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 la fibrosis quística MiSeqDx de Illumina 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 la fibrosis quística MiSeqDx 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

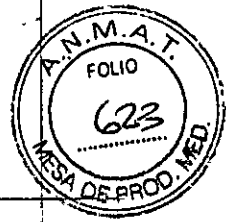
Abril de 2014

N.º de referencia 15038344 Rev. A ESP 164

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

0642



Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

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 %

Referencias

- 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.
- Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternan DL, Cheng E, Gibson RL, et ál. (2008) Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genetics in Medicine* 10(12):851-868.
- Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternan 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.
- Katkin JP. (2012) Cystic fibrosis: Clinical manifestations and diagnosis. Disponible en www.uptodate.com. [En línea]. 7 de diciembre de 2012.
- Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, et ál. 2008 Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 153(2):S4-S14.
- Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2010.
- Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). Disponible en www.genet.sickkids.on.ca/app. [En línea]. Agosto de 2013.
- 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.
- Rohlfis 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.
- Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, et ál. (2013) Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat Genet*. 25 de agosto [publicación electrónica antes de impresión].
- Castellani C, Cuppens H, Macek H Jr, Cassiman JJ, Kerem E, et ál. (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cystic Fibrosis* 7:179-196.
- Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). Disponible en www.cftr2.org. [En línea]. Agosto de 2013.

65 | N.º de referencia 15038344 Rev. A ESP

Lio. Alejandro Díez
Abogado
BioSystems S.A.

Abil 2014
Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

- 13 The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) Project. Disponible en www.nacconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf. [En línea]. Presentado por Garry 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.
- 14 Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, et ál. (2004) Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genetics in Medicine* 6(5): 387–391.
- 15 Pratt VM, Caggana M, Bridges C, Buller AM, DiAntonio L, et ál. (Mayo de 2009) Development of Genomic Reference Materials for Cystic Fibrosis Genetic Testing. *Journal of Molecular Diagnostics* 11(3): 186–193.
- 16 Amos J, Feldman GL, Grody WW, Monaghan K, Palomaki GE, et ál. (edición de 2008 revisada en marzo de 2011) American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Clinical Genetic Laboratories.
- 17 Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et ál. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine*. *Genetics in Medicine* 15(9): 733–747.

Patentes y marcas registradas

Este documento y su contenido son propiedad de Illumina, Inc. y sus afiliados ("Illumina") y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes en conexión con el uso de los productos descritos en él y no para ningún otro fin. Este documento y su contenido no se utilizarán ni distribuirán con ningún otro fin ni tampoco se 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 ni similares derechos de terceros.

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

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

ILLUMINA NO ASUME RESPONSABILIDAD ALGUNA QUE SURJA DEL USO INCORRECTO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS LAS PIEZAS O EL SOFTWARE) NI DEL USO DE DICHOS PRODUCTOS FUERA DEL ÁMBITO DE LAS LICENCIAS EXPRESAS ESCRITAS O LOS PERMISOS OTORGADOS POR ILLUMINA EN CONEXIÓN CON LA ADQUISICIÓN DE DICHOS PRODUCTOS POR PARTE DE LOS CLIENTES.

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

© 2012-2104 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Illumina y MiSeqDx son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de Illumina, Inc. Todas las demás marcas y nombres mencionados en el presente documento pertenecen a sus respectivos propietarios.

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

Información de contacto



Illumina
San Diego, 92122 California (EE. UU.)
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuera de Norteamérica)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH La Haya
Países Bajos



Abril de 2014
Lic. Alejandro Díez
Abogado
BioSystems S.A.

N.º de referencia 15038344 Rev. A/ESP 66

Dra. SILVANA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



944

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

Etiquetado de productos

Consulte la leyenda de los símbolos que se proporciona con cada kit para obtener información completa sobre los símbolos que pueden aparecer en el embalaje o el etiquetado de los productos.

67 | N.º de referencia 15038344 Rev. A ESP

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

Abril de 2014

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



illumina

Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

N.º de catálogo DX-102-1004: 2 experimentos, hasta 96 muestras por kit

N.º de catálogo DX-102-1003: 20 experimentos, hasta 960 muestras por kit

Uso previsto

El ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina es un sistema de diagnóstico *in vitro* cualitativo que se utiliza 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 ADN genómico aislado de muestras de sangre humana total periférica. Entre las variantes se incluyen las recomendadas por la institución estadounidense de genética médica (American College of Medical Genetics) en 2004¹ y la institución estadounidense de obstetras y ginecólogos (American College of Obstetricians and Gynecologists) en 2011.² La prueba se ha diseñado para el cribado de portadores en adultos en edad reproductiva y en pruebas de diagnóstico de confirmación de recién nacidos y niños, y como prueba inicial de respaldo en el diagnóstico de personas con posibles síntomas de fibrosis quística. Los resultados de esta prueba los debe interpretar un especialista en genética molecular clínica o equivalente certificado y se deben utilizar junto con otra información clínica y de laboratorio disponible.

Esta prueba no está indicada para el cribado de recién nacidos, pruebas diagnósticas de fetos, pruebas previas a implantaciones ni fines diagnósticos independientes.

La prueba está destinada para su uso en el instrumento MiSeqDx de Illumina.

Resumen y explicación del ensayo

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, lo que 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 progresión de la enfermedad pulmonar de la FQ. En consecuencia, un enfoque clave de los esfuerzos intervencionistas actuales es el diagnóstico precoz mediante el cribado de los recién nacidos⁷, lo que 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 la 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 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

Enfero de 2014

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º pieza 15088347 Rev. A ESP | 1

Dr. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

variantes de *CFTR* descritas, y la mayoría de ellas son mutaciones puntuales.⁹

La variante más habitual de la *CFTR* es el alelo F508del⁵, 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 FQ 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 todas las poblaciones étnicas y raciales en frecuencias distintas: una de cada 3000 personas de origen caucásico, uno de cada 9200 hispanoamericanos, uno de cada 10 900 americanos nativos, uno de cada 15 000 afroamericanos y uno de cada 31 000 asiático-americanos.^{4,6} En la Tabla 1 se proporcionan los cálculos actuales de frecuencia de portadores de la mutación de *CFTR* por etnias 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	1 en 84
Americano nativo	1 en 70
Asiático	1 en 242
Caucásico	1 en 28
De Oriente Medio	1 en 91
Hispano	1 en 59
Judío	1 en 32
Judío asquenazí	1 en 29
Sudasiático	1 en 118
Otra etnia	1 en 111
Más de un origen étnico	1 en 34
Mitad afroamericano	1 en 56
Mitad caucásico	1 en 32
Mitad hispano	1 en 51
No se indica	1 en 37
Todos los individuos	1 en 38

Descripción general del proyecto CFTR2

El proyecto CFTR2 es una iniciativa internacional liderada 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 la fibrosis quística con frecuencias de alelos de un mínimo del 0,01 %, 25 registros de fibrosis quística y médicos 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 que causan 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 ya 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* en el panel

Las variantes notificadas por el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx se seleccionaron específicamente porque representan todo el conjunto de variantes clínicamente validadas clasificadas como causantes de la FQ en la base de datos del CFTR2 de la universidad Johns Hopkins University, un producto de la iniciativa CFTR2.

El ensayo realiza pruebas de lo siguiente: 134 variantes que provocan la FQ, 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 que causan la FQ corresponden a 129 variantes que causan la FQ de la base de datos del CFTR2. La base de datos del CFTR2 incluye cinco variantes que causan la FQ 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). La lista de 139 variantes que especifica el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2 Resumen de variantes del Ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx

(Por orden de coordenadas genómicas; **negrita** = ACMG-23; *cursiva* = descritas de forma secundaria)

M1V	T338I	Q552X	3121-1G>A
CFTR dele2,3	1154insTC	R553X	3272-26A>G
Q39X	S341P	A559T	L1065P
E60X	R347H	R560T	R1066C
P67L	R347P	R560K	R1066H
R75X	R352Q	1811+1.6kb A>G	L1077P
G85E	1213delT	1812-1 G>A	W1089X
394delTT	1248+1G>A	E585X	Y1092X (C>A)
405+1 G>A	1259insA	1898+1G>A	Y1092X (C>G)
406-1G>A	W401X (c.1202G>A)	1898+3A>G	M1101K
E92X	W401X (c.1203G>A)	2143delT	E1104X
E92K	1341+1G>A	R709X	R1158X
Q98X	<i>Poli-TG/Poli-T</i>	K710X	R1162X
457TAT>G	1461ins4	2183delAA>G	3659delC
D110H	A455E	2184insA	S1196X
R117C	1525-1G>A	2184delA	W1204X (c.3611G>A)
R117H	S466X (C>A)	2307insA	W1204X (c.3612G>A)
Y122X	S466X (C>G)	L732X	3791delC
574delA	L467P	2347delG	3849+10kbC>T
621+1G>T	1548delG ¹	R764X	G1244E
663delT	S489X	2585delT	3876delA
G178R	S492F	E822X	S1251N
711+1G>T	Q493X	2622+1G>A	3905insT
711+3A>G	I507del	E831X	W1282X
711+5 G>A	F508del	W846X	4005+1G>A
712-1 G>T	1677delTA	R851X	N1303K
H199Y	V520F	2711delT	4016insT
P205S	Q525X ¹	2789+5G>A	Q1313X
L206W	1717-8G>A	Q890X	4209TGTT>AA
Q220X	1717-1G>A	L927P	CFTRdele22,23
852del22	G542X	S945L	4382delA
1078delT	S549R (c.1645A>C)	3007delG	I506V

Enero de 2014

Liz Alejandra Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º pieza 15088347 Rev. A ESP 13

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

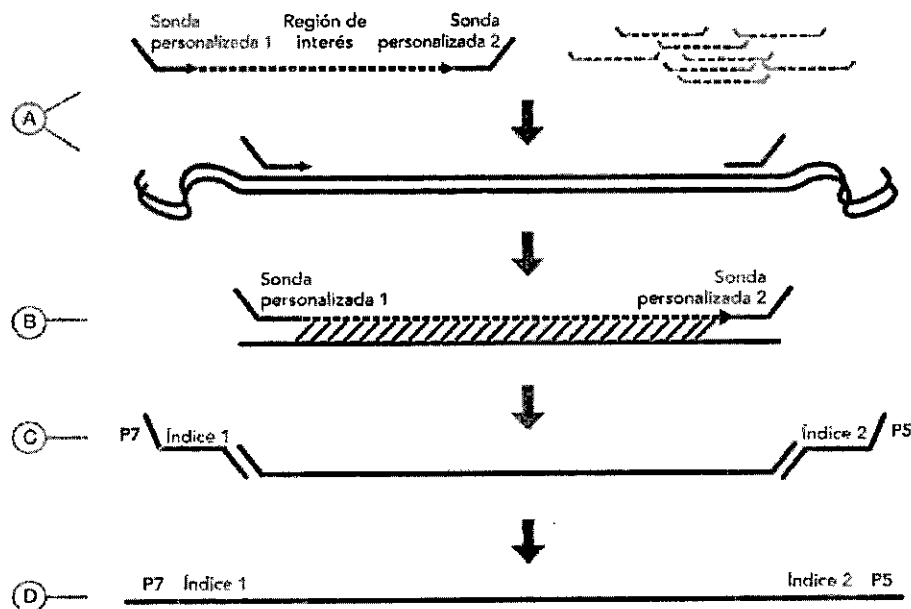
G330X	S549R (c.1647T>G)	G970R	I507V
R334W	S549N	3120G>A	F508C
I336K	G551D	3120+1G>A	

¹ Clasificado en la base de datos del CFTR2¹² como una variante que provoca la FQ, 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.

Principios del procedimiento

El ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina conlleva dos procedimientos principales. El primer procedimiento consiste en preparar manualmente las muestras para la secuenciación, lo que se denomina preparación de bibliotecas. La preparación de bibliotecas consta de cuatro pasos clave: la hibridación, la extensión-ligadura, la amplificación PCR y la normalización de bibliotecas. El segundo procedimiento consiste en secuenciar la muestra preparada mediante el uso de la química de SBS (secuenciación por síntesis) en MiSeqDx.

Preparación de bibliotecas



- A Hibridación:** El primer paso, la hibridación, hibridiza un grupo de oligonucleótidos ascendentes y descendentes específico del Ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx en relación con el ADN genómico de la muestra. 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 ADN polimerasa se extiende desde los oligonucleótidos ascendentes hasta la región objetivo, a lo que le sigue la ligadura hasta el extremo 5' del oligonucleótido descendente con una ADN ligasa. 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 de 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 se vale de un método basado en terminadores reversibles para detectar bases de nucleótido único 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 minimiza la tendencia a la incorporación. Las llamadas de bases se realizan directamente a partir de las mediciones de intensidad de la señal durante cada ciclo de secuenciación. El resultado final es la secuenciación base por base.

Análisis de datos

MiSeq Reporter procesa las llamadas de bases generadas durante el análisis principal y genera información sobre cada muestra según la información especificada en la hoja de muestras, lo que se denomina análisis secundario. El análisis secundario incluye el demultiplexado, la generación de archivos FASTQ, la alineación, las llamadas de variantes y la generación de archivos VCF que contienen información sobre las variantes de CFTR que se encuentran en posiciones específicas del genoma de referencia.

- **Demultiplexado:** Es el primer paso del análisis secundario si la hoja de muestras contiene varias muestras y el experimento tiene lecturas de índice. El demultiplexado separa datos de las muestras agrupadas en función de los índices de secuencia únicos que se añadieron durante el paso de amplificación PCR.
- **Generación de archivos FASTQ:** Tras el demultiplexado, MiSeq Reporter genera archivos intermedios en 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. MiSeq Reporter utiliza un algoritmo de Smith-Waterman de bandas que realiza las alineaciones de secuencias locales para determinar regiones similares entre dos secuencias.
- **Llamadas de variantes:** Este paso registra las variantes de nucleótido único (SNV), las inserciones y deleciones, y otras variantes estructurales en un archivo de prueba normalizado llamado MiSeqDxCF139VariantAssay.txt. Para obtener más información, consulte la sección Archivo del informe del análisis de la *Guía del usuario de MiSeq Reporter* (n.º de referencia 15038356_ESP).

Limitaciones del procedimiento

- 1 Para uso diagnóstico *in vitro*. Los resultados obtenidos con el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina se deben utilizar e interpretar en el marco de una evaluación clínica completa.
- 2 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. 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.
- 3 Las variantes identificadas con este ensayo varían en frecuencia en función de las distintas poblaciones.
- 4 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.

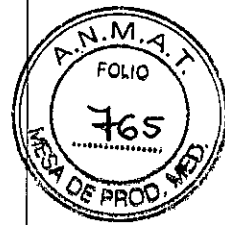
Enero de 2014

Lic. Alejandro Díez
 Apoderado
 BioSystems S.A.

N.º pieza 15038347 Rev. A ESP | 5

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

- 5 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.
- 6 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 17).

Componentes del producto

La plataforma MiSeqDx de Illumina consta de lo siguiente:

- Ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx (n.º de catálogo DX-102-1004 o DX-102-1003)
- Instrumento MiSeqDx (n.º de catálogo DX-410-1001)

Reactivos

Reactivos suministrados

Illumina proporciona los reactivos para el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina. El n.º de catálogo DX-102-1003 se ha configurado para 20 experimentos con un máximo de 48 muestras por experimento (hasta un total de 960 muestras). El n.º de catálogo DX-102-1004 se ha configurado para dos experimentos con un máximo de 48 muestras por experimento (hasta un total de 96 muestras).

Ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx, caja 1

Tabla 3 Reactivos de preamplificación de la caja 1A

Componente	Cantidad		Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Grupo de oligonucleótidos de 139 variantes de fibrosis quística	10 tubos	1 tubo	600 μ l	Solución acuosa tamponada que contiene oligonucleótidos específicos para el gen de CFTR	Entre -25 °C y -15 °C
Tampón de hibridación	10 tubos	1 tubo	4,32 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales y formamida	Entre -25 °C y -15 °C
Mezcla de extensión-ligadura	10 tubos	1 tubo	4,8 ml	Solución acuosa tamponada que contiene una mezcla patentada de ADN polimerasas, ADN ligasa y dNTP	Entre -25 °C y -15 °C
Cebadores de índice A (A501) - H (A508)	10 tubos por cebador	1 tubo por cebador	192 μ l	Cebadores de PCR con secuencias de índice y adaptadores de secuenciación	Entre -25 °C y -15 °C
Cebadores de índice I (A701) - 12 (A712)	10 tubos por cebador	1 tubo por cebador	128 μ l	Cebadores de PCR con secuencias de índice y adaptadores de secuenciación	Entre -25 °C y -15 °C
Polimerasa de PCR	10 tubos	1 tubo	56 μ l	ADN polimerasa patentada	Entre -25 °C y -15 °C
Mezcla maestra de PCR	10 tubos	1 tubo	2,8 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales y dNTP	Entre -25 °C y -15 °C

6 | N.º pieza 15038347 Rev. A ESP

Lic. Alejandro Díez
 Apoderado
 BioSystems S.A.

Enero de 2014
 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

944



Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx

Tabla 4 Reactivos de posamplificación de la caja 1B

Componente	Cantidad		Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Diluyente de normalización de bibliotecas	10 tubos	1 tubo	4,6 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales, 2-mercaptoetanol y formamida	Entre -25 °C y -15 °C
Tampón de dilución de biblioteca	10 tubos	1 tubo	4,5 ml	Solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Control interno PhiX	1 tubo	1 tubo	10 µl	Solución acuosa tamponada que contiene ADN genómico PhiX	Entre -25 °C y -15 °C

Ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx, caja 2

Tabla 5 Reactivos de posamplificación de la caja 2

Componente	Cantidad		Contenido	Almacenamiento
	DX-102-1003	DX-102-1004		
Cartucho de reactivo de MiSeqDx del ensayo de 139 variantes de FQ	20 cartuchos	2 cartuchos	Cartucho de un solo uso que contiene reactivos para la generación y secuenciación de grupos para su uso con MiSeqDx, incluidos formamida, 2-mercaptoetanol y DMSO <2 %	Entre -25 °C y -15 °C

Ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx, caja 3

Tabla 6 Reactivos de preamplificación de la caja 3A

Componente	Cantidad		Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Tampón de lavado restrictivo	10 botellas	1 botella	24 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales, 2-mercaptoetanol y formamida	Entre 2 °C y 8 °C
Tampón de lavado universal	10 tubos	1 tubo	4,8 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales	Entre 2 °C y 8 °C

Tabla 7 Reactivos de posamplificación de la caja 3B

Componente	Cantidad		Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Bolas de limpieza de PCR	10 tubos	1 tubo	5 ml	Solución acuosa tamponada que contiene bolas paramagnéticas de fase sólida y polietilenglicol	Entre 2 °C y 8 °C
Lavado de normalización de bibliotecas	20 tubos	2 tubos	4,8 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales, 2-mercaptoetanol y formamida	Entre 2 °C y 8 °C
Bolas de biblioteca	10 tubos	1 tubo	1,2 ml	Solución acuosa tamponada que contiene bolas paramagnéticas de fase sólida	Entre 2 °C y 8 °C
Celda de flujo de MiSeqDx del ensayo de 139 variantes de FQ	20 contenedores	2 contenedores	1 celda de flujo	Sustrato de cristal con oligonucleótidos ligados de manera covalente	Entre 2 °C y 8 °C

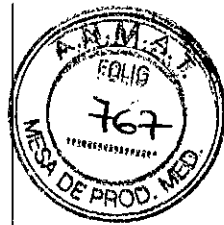
enero de 2014

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º pieza 15038547 Rev. A ESP | 7

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

Ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx, caja 4

Tabla 8 Reactivos de posamplificación de la caja 4

Componente	Cantidad		Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Solución SBS de MiSeqDx (PR2) del ensayo de 139 variantes de FQ	20 botellas	2 botellas	353,1 ml	Solución acuosa tamponada	Entre 2 °C y 8 °C

Ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx, caja 5

Tabla 9 Reactivos de preamplificación de la caja 5

Componente	Cantidad		Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Placa del filtro	20 placas	2 placas	N/A	Placa de microtitulación de polipropileno con una membrana de polietersulfona modificada	Entre 15 °C y 30 °C

Tabla 10 Reactivos de posamplificación de la caja 5

Componente	Cantidad		Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Tampón de elución	10 tubos	1 tubo	4,8 ml	Solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de almacenamiento de biblioteca	10 tubos	1 tubo	3,5 ml	Solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C

Reactivos necesarios no suministrados

Reactivos de preamplificación

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

Reactivos de posamplificación

- NaOH 10 N (preparación a partir de comprimidos o uso de una solución estándar)
- Etanol, 200 proof, para biología molecular
- Tampón TE
- Agua sin ARNasa ni ADNasa

Almacenamiento y manipulación

- 1 La temperatura ambiente se define como la temperatura que oscila entre 15 °C y 30 °C.
- 2 Los siguientes reactivos se suministran congelados y permanecen estables cuando se almacenan a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C hasta la fecha de caducidad especificada.
 - grupo de oligonucleótidos de 139 variantes de fibrosis quística
 - tampón de hibridación
 - mezcla de extensión-ligadura
 - cebadores de índice A (A501) - H (A508)

- cebadores de índice 1 (A701) - 12 (A712)
- polimerasa de PCR
- mezcla maestra de PCR
- diluyente de normalización de bibliotecas
- tampón de dilución de biblioteca
- control interno PhiX
- cartucho de reactivo de MiSeqDx del ensayo de 139 variantes de FQ

Salvo en el caso del cartucho de reactivo, los reactivos permanecen estables durante un máximo de seis ciclos de congelación/descongelación antes de la fecha de caducidad especificada.

No vuelva a congelar el cartucho de reactivo una vez descongelado. Se puede almacenar hasta seis horas a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.

- 3 Los siguientes reactivos 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.
 - tampón de lavado restrictivo
 - tampón de lavado universal
 - bolas de limpieza de PCR
 - bolas de biblioteca
 - lavado de normalización de bibliotecas
 - solución SBS de MiSeqDx (PR2) del ensayo de 139 variantes de FQ
 - celda de flujo de MiSeqDx del ensayo de 139 variantes de FQ
- 4 Los siguientes reactivos se suministran a temperatura ambiente y permanecen estables cuando se almacenan a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad especificada.
 - tampón de elución
 - placa del filtro
 - tampón de almacenamiento de biblioteca
- 5 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.
- 6 Los reactivos de tampón de hibridación, tampón de lavado restrictivo y diluyente de normalización de bibliotecas pueden formar precipitados o cristales visibles. Antes de su uso, agite con fuerza y, a continuación, inspeccione visualmente para garantizar que no haya precipitados.
- 7 Siga estas prácticas recomendadas para la manipulación de las bolas de limpieza de PCR y las bolas de biblioteca:
 - No se deben congelar las bolas en ningún caso.
 - Deje que las bolas alcancen la temperatura ambiente.
 - Justo antes de su uso, agite las bolas hasta que queden bien suspendidas y se muestre un color homogéneo.
 - Mezcle bien la muestra después de añadir las bolas pipeteando arriba y abajo diez veces. Se puede utilizar un mezclador para mezclar las muestras de forma homogénea.
 - 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 se aclare. Mantenga la placa en el soporte magnético mientras aspira lentamente el sobrenadante y evite alterar las bolas apartadas.
- 8 La placa de amplificación PCR puede permanecer en el ciclador térmico durante toda la noche. También se puede almacenar a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C hasta dos días. Antes de almacenar la placa a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C, selle el pocillo de la placa.
- 9 No congele las bolas de biblioteca ni las mezcle con el reactivo de diluyente de normalización de bibliotecas si no se van a utilizar de manera inmediata.

Enero de 2014

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º pieza 15038347 Rev. A ESP | 9

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

- 10 La placa de normalización de bibliotecas completa se puede almacenar a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C hasta tres días.
- 11 La biblioteca de amplicones agrupados se puede almacenar a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C hasta tres días.
- 12 Cargue inmediatamente el grupo de amplicón diluido recién preparado en el cartucho de reactivo. El almacenamiento del grupo de amplicón diluido puede reducir considerablemente la densidad de grupos.

Materiales y equipo

Materiales y equipo suministrados vendidos por separado

- 1 **Instrumento MiSeqDx**, n.º de catálogo DX-410-1001
- 2 **Kit TruSeq Index Plate Fixture**, n.º de catálogo FC-130-1005
- 3 **Kit TruSeq Index Plate Fixture & Collar**, n.º de catálogo FC-130-1007
- 4 **Tapones de recambio para el adaptador de índices**, n.º de catálogo DX-502-1003

Materiales y equipo necesarios no suministrados

Equipo y materiales de preamplificación

- 1 **Bloque de calor**: Se precisa un bloque de calor para una placa de 96 pocillos. El bloque de calor debe cumplir con las especificaciones de rendimiento siguientes. Los bloques de calor con tapas calientes se pueden utilizar.
 - Rango de temperatura: Ambiente de 5 °C a 99 °C
 - Regulación de temperatura: $\pm 0,1$ °C a 37 °C; $\pm 0,4$ °C a 60 °C
- 2 **Incubadora de muestras**: Se precisa una incubadora (horno de hibridación). La incubadora debe cumplir con las especificaciones de rendimiento siguientes:
 - Rango de temperatura: Entre 10 °C y 100 °C
 - Regulación de temperatura: $\pm 0,2$ °C
- 3 **Centrifugadora de sobremesa**: Se precisa una centrifugadora de sobremesa que pueda mantener 20 °C. (Se precisa una centrifugadora independiente en el área de posamplificación). Se admite cualquier centrifugadora de placas que alcance las velocidades indicadas del protocolo (de 280 a 2400 x g).
- 4 **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 % del volumen indicado.
- 5 **Consumibles**: Se precisan los consumibles siguientes.
 - Placas de PCR con faldones de 96 pocillos de 0,2 ml de polipropileno o equivalente
NOTA: Asegúrese de que la placa de 96 pocillos sea compatible con el soporte magnético.
 - Placas de almacenamiento de 96 pocillos de 0,8 ml (placas MIDI)
 - Recipiente de solución de PVC sin ADNasa ni ARNasa (cubeta)
 - Sello de película de aluminio adhesiva
 - Sello para placas de PCR adecuado
 - Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles

Materiales y equipo de la posamplificación

- 1 **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: Entre 4 °C y 99 °C
 - Precisión de control: $\pm 0,25$ °C de 35 °C a 99 °C

- 2 **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 rpm
 - Rango de velocidad de mezcla: De 200 a 3000 rpm
- 3 **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 x g).
- 4 **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: Ambiente de 5 °C a 99 °C
 - Regulación de temperatura: $\pm 0,1$ °C a 37 °C; $\pm 0,4$ °C a 60 °C
- 5 **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.
- 6 **Pipetas de precisión:** Se precisa un conjunto de pipetas de precisión. (Se precisa 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 % del volumen indicado.
- 7 **Consumibles:** Se precisan los consumibles siguientes.
 - Placas de PCR con faldones de 96 pocillos de 0,2 ml de polipropileno o equivalente
NOTA: Asegúrese de que la placa de 96 pocillos sea compatible con el soporte magnético.
 - Placas de almacenamiento de 96 pocillos de 0,8 ml (placas MIDI)
 - Tubos cónicos de 15 ml
 - Tubos de microcentrifuga Eppendorf (recomendados con cierre de rosca)
 - Gradillas de ocho tubos de PCR
 - Recipiente de solución de PVC sin ADNasa ni ARNasa (cubeta)
 - Sello de película de aluminio adhesiva
 - Sello adhesivo para placas
 - Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles

Recopilación, transporte y almacenamiento de muestras



NOTA

Manipule todas las muestras como si fueran agentes potencialmente infecciosos.

- 1 Se pueden utilizar muestras de sangre total recogidas en tubos EDTA K₂.
- 2 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.
- 3 Es posible transportar sangre total durante un máximo de siete días a temperatura ambiente, 30 días a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C o 30 días congelada 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.
- 4 No se han observado efectos adversos en el rendimiento del ensayo al someter el ADN genómico a seis ciclos de congelación y descongelación.
- 5 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.

Enero de 2014

Lic. Alejandro Diez
Abogado
BioSystems S.A.

N.º pieza 15038347 Reg. A/ESP 11

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

Advertencias y precauciones



PRECAUCIÓN

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

- 1 Algunos componentes de este ensayo contienen formamida, una amida alifática que es una toxina reproductiva probable. (Consulte *Reactivos* en la página 6 para obtener más información). Evite su inhalación o ingestión, o el contacto con la piel o los ojos, pues podrían producirse lesiones. Deseche los contenedores y los contenidos no utilizados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona. Para obtener más información, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
- 2 Algunos componentes de este ensayo contienen 2-mercaptoetanol, un agente reductor. (Consulte *Reactivos* en la página 6 para obtener más información). Evite su inhalación o ingestión, o el contacto con la piel o los ojos, pues podrían producirse 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, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
- 3 Manipule todas las muestras como si fueran agentes potencialmente infecciosos.
- 4 El incumplimiento de los procedimientos descritos puede provocar resultados erróneos o una reducción considerable de la calidad de las muestras.
- 5 Tenga en cuenta las precauciones habituales 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.
- 6 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. Tenga en cuenta que los lotes de ensayo se identifican con la etiqueta de la caja del ensayo.
- 7 Almacene los componentes del ensayo a la temperatura especificada en las áreas de preamplificación y posamplificación designadas.
- 8 Los ciclos de congelación y descongelación repetidos (hasta seis) de los componentes de la caja 1 no afectarán a la integridad del ensayo.
- 9 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.
- 10 Se precisa seguir 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 arrojar resultados poco precisos y fiables.
- 11 Para evitar la contaminación, asegúrese de que las áreas de preamplificación y posamplificación dispongan de equipos especializados (tales como pipetas, puntas de pipetas, mezcladores vorticiales y centrifugadoras).
- 12 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 de restos de amplicones y de contaminación cruzada entre muestras.
- 13 El emparejamiento de muestras de índice debe coincidir exactamente con la hoja de muestras. Las incoherencias entre la hoja de muestras y la disposición de placas provocará la pérdida de identificación de muestras positivas y la generación de informes con resultados incorrectos.
- 14 Para el procedimiento de lavado, prepare siempre una solución nueva con etanol al 80 %. El etanol puede absorber agua del aire y afectar a los resultados.
- 15 Asegúrese siempre de eliminar el etanol del fondo de los pocillos durante el procedimiento de lavado. Los restos de etanol pueden afectar a los resultados.

- 16 Cumpla el tiempo de secado especificado siguiendo el paso relativo al soporte magnético para garantizar una evaporación completa. Los restos de etanol pueden afectar al rendimiento de las reacciones posteriores.
- 17 No mezcle el grupo de oligonucleótidos de 139 variantes de fibrosis quística y el tampón de hibridación para el almacenamiento. Al combinarse, el grupo de oligonucleótidos de 139 variantes de fibrosis quística se vuelve inestable incluso si se almacena congelado.
- 18 No se recomienda 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.
- 19 Añada siempre polimerasa de PCR a la mezcla maestra de PCR justo antes de su uso. Nunca almacene la solución de trabajo combinada.
- 20 Durante el paso de normalización de bibliotecas, es muy importante resuspender por completo el pellet de las bolas de la biblioteca. Esto resulta fundamental para lograr una densidad de grupos homogénea en la celda de flujo de MiSeqDx.
- 21 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.
- 22 Debido al número de transferencias de placas y al potencial de contaminación consiguiente, se debe prestar especial atención para garantizar que el contenido de los pocillos permanezca completamente en el pocillo. Evite las salpicaduras de contenido.
- 23 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.
- 24 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. Las variantes con la designación No Call (Ausencia de llamada) no se deben notificar, 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).

Notas del procedimiento

- 1 Ilumina 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. Ilumina recomienda el uso de un control salvaje. El control salvaje se debe procesar como muestra y no debe sustituir al control positivo o negativo.
- 2 Antes de iniciar el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx, extraiga y cuantifique el ADN.
- 3 Se puede utilizar cualquier método de extracción de ADN validado.
- 4 Cuantifique el ADN con un espectrómetro. Verifique que A260/A280 de la muestra de ADN sea superior a 1,5. Normalice la muestra de ADN a 50 ng/μl. Cada muestra requiere 5 μl de ADN genómico (total de 250 ng).

Producción de muestras y representación de índices

Para el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina, la producción de muestras por experimento MiSeqDx es de entre 8 y 48 muestras. Los cebadores de índice utilizados durante la amplificación PCR se deben elegir en función del rendimiento final de muestras que se desee con el fin de garantizar la diversidad de la secuencia de índice.



NOTA

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

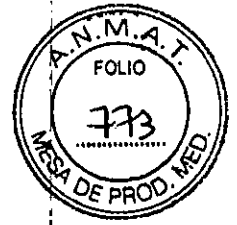
MiSeqDx utiliza un LED verde para secuenciar bases G/T y un LED rojo para secuenciar bases A/C. En cada ciclo, se debe leer como mínimo uno de los dos nucleótidos de cada canal de color para garantizar un registro adecuado.

Enero de 2014

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º pieza 15038347 Rev. A/ESP | 13

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



Resulta importante mantener el equilibrio de colores de cada base de la lectura de índice que es objeto de secuenciación, ya que, de lo contrario, se podría producir un error de registro durante la secuenciación de la lectura del índice.

Consulte la Tabla 11 para elegir las combinaciones de cebadores de índice para experimentos de 48 o 96 muestras.

Tabla 11 Combinaciones de cebadores de índice para experimentos de secuenciación de 48 o 96 muestras

Filas de la A a la H	Columnas de la 1 a la 6	Columnas de la 7 a la 12
Cebador de índice A (A501)	Cebador de índice 1 (A701)	Cebador de índice 6 (A706)
Cebador de índice B (A502)	Cebador de índice 2 (A702)	Cebador de índice 7 (A707)
Cebador de índice C (A503)	Cebador de índice 3 (A703)	Cebador de índice 8 (A708)
Cebador de índice D (A504)	Cebador de índice 4 (A704)	Cebador de índice 9 (A709)
Cebador de índice E (A505)	Cebador de índice 5 (A705)	Cebador de índice 11 (A711)
Cebador de índice F (A506)	Cebador de índice 10 (A710)	Cebador de índice 12 (A712)
Cebador de índice G (A507)	--	--
Cebador de índice H (A508)	--	--

Si la secuenciación es inferior a 48 muestras en un experimento de secuenciación, seleccione los índices apropiados de acuerdo con sus secuencias para mantener el equilibrio de colores en los canales verde y rojo. Consulte la Tabla 13 y la Tabla 14. Como mínimo, los experimentos que emplean entre 8 y 48 muestras deben incluir las combinaciones de cebadores de índice que se muestran en la Tabla 12.

Para procesar con precisión experimentos más pequeños, se debe disponer de un mínimo de ocho muestras. Si no se dispone de seis muestras únicas (excluidos los controles positivos y negativos), se puede completar el experimento con duplicados de muestras o con cualquier muestra de ADN genómico humano. Consulte la Tabla 12 para obtener información sobre el conjunto mínimo de índices con equilibrio de color que utilizar para los experimentos de secuenciación de ocho muestras.


Tabla 12. Combinaciones de cebadores de índice para experimentos de secuenciación de ocho muestras

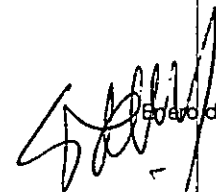
	Cebador de índice 1 (A701)	Cebador de índice 2 (A702)	Cebador de índice 10 (A710)
Cebador de índice C (A503)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Cebador de índice D (A504)	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
Cebador de índice E (A505)	Muestra 7	Muestra 8	--

Secuencias del cebador de índice

Tabla 13 Secuencias para cebadores de índice A (A501) - H (A508)

Cebador de índice	Secuencia
Cebador de índice A (A501)	TGAACCTT
Cebador de índice B (A502)	TGCTAAGT
Cebador de índice C (A503)	TGTTCTCT
Cebador de índice D (A504)	TAAGACAC
Cebador de índice E (A505)	CTAATCGA


 Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 BioSystems S.A.


 Enero de 2014
 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

Cebador de índice	Secuencia
Cebador de índice F (A506)	CTAGAACA
Cebador de índice G (A507)	TAAGTTCC
Cebador de índice H (A508)	TAGACCTA

Tabla 14 Secuencias para cebadores de índice 1 (A701) - 12 (A712)

Cebador de índice	Secuencia
Cebador de índice 1 (A701)	ATCACGAC
Cebador de índice 2 (A702)	ACAGTGGT
Cebador de índice 3 (A703)	CAGATCCA
Cebador de índice 4 (A704)	ACAAACGG
Cebador de índice 5 (A705)	ACCCAGCA
Cebador de índice 6 (A706)	AACCCCTC
Cebador de índice 7 (A707)	CCCAACCT
Cebador de índice 8 (A708)	CACCACAC
Cebador de índice 9 (A709)	GAAACCCA
Cebador de índice 10 (A710)	TGTGACCA
Cebador de índice 11 (A711)	AGGGTCAA
Cebador de índice 12 (A712)	AGGAGTGG

Instrucciones de uso

Preparación de la hoja de muestras de MiSeqDx

- 1 En la pantalla Welcome (Bienvenida) del Gestor de la lista de trabajos de Illumina (IWM), seleccione **Create Worklist** (Crear lista de trabajo).
- 2 En el campo Test Type (Tipo de prueba), seleccione **ensayo de 139 variantes de FQ**.
- 3 En el campo Worklist Name (Nombre de la lista de trabajo), introduzca un nombre para la hoja de muestras.
 - Si se usa el ID alfanumérico del código de barras del cartucho de reactivo para el nombre de la hoja de muestras, el Software operativo de MiSeq (MOS) encontrará la hoja de muestras automáticamente.
 - Si se asigna otro nombre a la hoja de muestras, se puede usar el botón **Browse** (Examinar) del Software operativo de MiSeq (MOS) para localizar la hoja de muestras correspondiente.
- 4 [Opcional] Escriba una descripción para identificar el experimento.
- 5 Asegúrese de que la fecha coincida con la fecha de inicio del experimento.
- 6 Seleccione **Next** (Siguiendo).

Introducción de información de la muestra

- 1 En la ficha Table (Tabla) o Plate (Placa), introduzca la siguiente información de cada pocillo de muestra:
 - a **Sample ID (ID de muestra)**: Introduzca un ID de muestra único.

Enero de 2014

Lic. Alejandro Diez
 Abogado
 BioSystems S.A.

N.º pieza 15038347 Rev. A ESP 15

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

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

Hibridación de grupo de oligonucleótidos

Preparación

- 1 Deje que el grupo de oligonucleótidos de 139 variantes de fibrosis quística, el tampón de hibridación, las muestras de ADN genómico y la muestra de control positivo alcancen la temperatura ambiente.
- 2 Agite el grupo de oligonucleótidos de 139 variantes de fibrosis quística y el tampón de hibridación con fuerza para asegurarse de que todos los precipitados se hayan disuelto por completo y, a continuación, centrifugue brevemente los tubos para recoger el líquido.
- 3 Caliente un bloque de calor de 96 pocillos a 95 °C.
- 4 Precaliente una incubadora a 37 °C.
- 5 Cree la placa de muestras de acuerdo con el gráfico de placa impreso con el IWM.

Procedimiento

- 1 Disponga una nueva placa de PCR de 96 pocillos (en adelante, placa **HYB**).
- 2 Añada 5 µl de muestra o control a 50 ng/µl (250 ng total) en los pocillos correspondientes de la placa **HYB**. Siga la disposición de placas generada para una selección correcta de los pocillos.
- 3 Añada 5 µl de grupo de oligonucleótidos de 139 variantes de fibrosis quística en todos los pocillos que contienen ADN genómico.
- 4 Añada 40 µl de tampón de hibridación en cada muestra de la placa **HYB**. Pipetee con cuidado arriba y abajo entre tres y cinco veces para mezclar.
- 5 Selle la placa **HYB** y centrifugue a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- 6 Coloque la placa **HYB** en el bloque precalentado a 95 °C e incúbela durante un minuto.
- 7 Reduzca la temperatura del bloque de calor a 40 °C y sígalo incubando hasta que alcance los 40 °C (aproximadamente, unos 80 minutos).

Para una hibridación adecuada es fundamental una refrigeración gradual; por lo tanto, no se recomiendan los cicladores térmicos para PCR con refrigeración activa (por ejemplo, efecto Peltier o refrigeración termoeléctrica) para este proceso.



PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

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

Eliminación de oligonucleótidos sin ligar

Preparación

- 1 Deje que la mezcla de extensión-ligadura, el tampón de lavado restrictivo y el tampón de lavado universal alcancen la temperatura ambiente y, a continuación, agite brevemente.
- 2 Monte el conjunto de la unidad de la placa del filtro (en adelante, **FPU**) desde la parte superior hasta la parte inferior: tapa, placa del filtro, collar adaptador y 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 $2400 \times g$ a $20^\circ C$ durante cinco minutos.

Procedimiento

- 1 Retire la placa **HYB** del bloque de calor y centrifugue a $1000 \times g$ a $20^\circ C$ durante un minuto.
- 2 Transfiera el volumen íntegro (aproximadamente $55 \mu l$) de cada muestra a los pocillos correspondientes de la placa del filtro.
- 3 Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a $2400 \times g$ a $20^\circ C$ durante cinco minutos.
- 4 Lave la placa del filtro como se indica a continuación:
 - a Añada $45 \mu l$ de tampón de lavado restrictivo en cada pocillo de muestra.
 - b Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a $2400 \times g$ a $20^\circ C$ durante cinco minutos.
- 5 Repita el lavado tal y como se describe en el paso anterior.



NOTA

Si el tampón de lavado no se drena completamente, vuelva a centrifugar a $2400 \times g$ a $20^\circ C$ hasta que haya pasado todo el líquido (unos cinco o diez minutos adicionales).

- 6 Deseche todo el flujo (que contiene formamida) recogido hasta este punto y, a continuación, vuelva a montar la **FPU**.
- 7 Añada $45 \mu l$ de tampón de lavado universal en cada pocillo de muestra.
- 8 Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a $2400 \times g$ a $20^\circ C$ durante diez minutos.



NOTA

Asegúrese de que se haya drenado todo el líquido tras el centrifugado. Repita el centrifugado en caso necesario.

Extensión-ligadura de oligonucleótidos ligados

Procedimiento

- 1 Añada $45 \mu l$ de mezcla de extensión-ligadura en cada pocillo de muestra de la placa del filtro.
- 2 Selle la placa del filtro con película de aluminio adhesiva y, a continuación, cúbrala con la tapa.
- 3 Incube la **FPU** en la incubadora precalentada a $37^\circ C$ durante 45 minutos.

Amplificación PCR

Preparación

- 1 Prepare NaOH 0,05 N nuevo.
- 2 Determine los cebadores de índice que se deben utilizar de acuerdo con la impresión del gráfico de la placa del Gestor de la lista de trabajos de Illumina.
- 3 Deje que la mezcla maestra de PCR y los cebadores de índice adecuados alcancen la temperatura ambiente. Agite cada tubo congelado para mezclarlo y, a continuación, centrifugue brevemente los tubos.
- 4 Disponga una nueva placa de PCR de 96 pocillos (en adelante, placa **AMP**).
- 5 Añada cebadores de índice a la placa **AMP** como se indica a continuación:
 - a Añada $4 \mu l$ de cebadores de índice seleccionados [A (A501) – H (A508)] al pocillo correspondiente en una columna de la placa **AMP**.
 - b Deseche los tapones blancos originales y coloque tapones blancos nuevos.
 - c Añada $4 \mu l$ de cebadores de índice seleccionados [1 (A701) – 12 (A712)] a la fila correspondiente de la placa **AMP**. *Se deben cambiar las puntas después de cada fila para evitar la contaminación cruzada entre índices.*
 - d Deseche los tapones naranjas originales y coloque tapones naranjas nuevos.
- 6 Prepare la solución de trabajo de PCR de mezcla maestra de PCR/polimerasa de PCR tal y como se indica a continuación:
 - a Para 96 muestras, añada $56 \mu l$ de polimerasa de PCR a 2,8 ml de mezcla maestra de PCR.
 - b Invierta la solución de trabajo de PCR preparada 20 veces para mezclarla.

Enero de 2014

Lic. Alejandro Díez
Apodado
BioSystems S.A.

N.º pieza 1503847 (REV. A) ESP 17

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

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

Procedimiento

- 1 Retire la FPU de la incubadora y, a continuación, retire el sello de película de aluminio.
- 2 Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a $2400 \times g$ a 20°C durante dos minutos.
- 3 Añada $25 \mu\text{l}$ de NaOH 0,05 N en cada pocillo de muestra en la placa del filtro. Pipetee NaOH arriba y abajo cinco o seis veces.
- 4 Cubra e incube la placa del filtro a temperatura ambiente durante cinco minutos.
- 5 Mientras la placa del filtro se incuba, transfiera $22 \mu\text{l}$ de la solución de trabajo de PCR a cada pocillo de la placa AMP que contiene cebadores de índice.
- 6 Transfiera muestras eluidas desde el filtro hasta la placa AMP como se indica a continuación:
 - a Pipetee las muestras en la primera columna de la placa del filtro arriba y abajo cinco o seis veces.
 - b Transfiera $20 \mu\text{l}$ desde la placa del filtro a la columna correspondiente de la placa AMP.
 - c Pipetee con cuidado arriba y abajo cinco o seis veces para combinar bien el ADN con la solución de trabajo de PCR.
 - d Transfiera las columnas restantes desde la placa del filtro a la placa AMP de una manera similar. *Se deben cambiar las puntas después de cada columna para evitar la contaminación cruzada entre índices y muestras.*
- 7 Selle la placa AMP y asegúrela con un rodillo de goma.
- 8 Centrifugue a $1000 \times g$ a 20°C durante un minuto.
- 9 Transfiera la placa AMP al área de posamplificación.
- 10 Realice el proceso de PCR siguiendo este programa en un ciclador térmico:
 - 95°C durante 3 minutos
 - 25 ciclos de:
 - 95°C durante 30 segundos
 - 62°C durante 30 segundos
 - 72°C durante 60 segundos
 - 72°C durante 5 minutos
 - Mantenga la temperatura a 10°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°C a 8°C hasta 48 horas.

Limpieza de PCR

Preparación

- 1 Deje que las bolas de limpieza de PCR alcancen la temperatura ambiente.
- 2 Prepare una solución nueva con etanol al 80 % a partir de una solución de etanol absoluta.

Procedimiento

- 1 Centrifugue la placa AMP a $1000 \times g$ a 20°C durante un minuto.
- 2 Disponga una nueva placa MIDI (en adelante, placa CLP).
- 3 Invierta las bolas de limpieza de PCR 10 veces. Agite con vigor y, a continuación, invierta 10 veces más. Inspeccione visualmente la solución para garantizar que las bolas están resuspendidas.
- 4 Añada $45 \mu\text{l}$ de bolas de limpieza de PCR en cada pocillo de la placa CLP.
- 5 Transfiera todo el producto de PCR de la placa AMP a la placa CLP.
- 6 Selle la placa CLP y agítela en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante dos minutos.
- 7 Incube a temperatura ambiente sin agitar durante 10 minutos.

- 8 Coloque la placa en un soporte magnético durante un mínimo de dos minutos o hasta que el sobrenadante se distinga con claridad.
- 9 Con la placa CLP en el soporte magnético, extraiga y deseche con cuidado el sobrenadante.
- 10 Con la placa CLP en el soporte magnético, lave las bolas tal y como se indica a continuación:
 - a Añada 200 µl de etanol al 80 % recién preparado en cada pocillo de muestra.
 - b Incube la placa en el soporte magnético durante un mínimo de 30 segundos o hasta que el sobrenadante se distinga con claridad.
 - c Extraiga y deseche con cuidado el sobrenadante.
- 11 Repita el lavado tal y como se describe en el paso anterior.
- 12 Utilice una pipeta multicanal P20 con configuración de pipeteo a 20 µl para extraer el exceso de etanol.
- 13 Retire la placa CLP del soporte magnético y deje secar las bolas durante 10 minutos.
- 14 Añada 30 µl de tampón de elución en cada muestra y, a continuación, agite brevemente.
- 15 Selle la placa CLP y agítela en un agitador de microplacas a 1800 rpm 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 CLP en el soporte magnético durante un mínimo de dos minutos o hasta que el sobrenadante se distinga con claridad.
- 18 Disponga una nueva placa MIDI (en adelante, placa LNP).
- 19 Transfiera 20 µl del sobrenadante de la placa CLP a la placa LNP.
- 20 [Opcional] Transfiera los 10 µl de sobrenadante restante de la placa CLP a una nueva placa y asigne una etiqueta a la placa que incluya un nombre de experimento y la fecha. 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 de bibliotecas**Preparación**

- 1 Prepare NaOH 0,1 N nuevo.
- 2 Deje que el diluyente de normalización de bibliotecas, las bolas de biblioteca y el lavado de normalización de bibliotecas alcancen la temperatura ambiente.
- 3 Agite el diluyente de normalización de bibliotecas con vigor y asegúrese de que todos los precipitados se hayan disuelto por completo.
- 4 Agite las bolas de biblioteca con vigor durante un minuto invirtiéndolas de manera intermitente hasta que las bolas se resuspendan y no quede pellet en el fondo del tubo cuando este se invierte.

Procedimiento

- 1 Mezcle el diluyente de normalización de bibliotecas y la bolas de biblioteca en un tubo cónico nuevo de 15 ml como se indica a continuación:

**NOTA**

Si se van a procesar menos de 24 muestras, utilice un tubo nuevo de 1,5 ml.

- a Para 96 muestras, añada 4,4 ml de diluyente de normalización de bibliotecas.
- b Pipetee las bolas de biblioteca arriba y abajo 10 veces para resuspender.

Enero de 2014

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º pieza 15038347 Rev. A ESP 9

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



NOTA

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

- c Para 96 muestras, pipetee 800 μ l de bolas de biblioteca en el tubo que contiene diluyente de normalización de bibliotecas.
- d Dé la vuelta al tubo entre 15 y 20 veces para mezclar el contenido.
- 2 Añada 45 μ l de la solución de trabajo diluyente de normalización de bibliotecas/bolas de biblioteca combinada en cada pocillo de la placa LNP que contiene bibliotecas.
- 3 Selle la placa LNP y agítela en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante 30 minutos.
- 4 Coloque la placa en un soporte magnético durante un mínimo de dos minutos o hasta que el sobrenadante se distinga con claridad.
- 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 el 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 rpm durante cinco 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 en cada pocillo.
- 10 Selle la placa LNP y agítela en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante cinco minutos.
- 11 Durante los cinco minutos de elución, disponga una nueva placa de PCR de 96 pocillos (en adelante, placa SGP).
- 12 Añada 30 μ l de tampón de almacenamiento de biblioteca a cada pocillo que se debe utilizar en la placa SGP.
- 13 Tras la elución de cinco minutos, 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 para resuspender las bolas y, a continuación, agite cinco minutos más.
- 14 Coloque la placa LNP en el soporte magnético durante un mínimo de dos minutos.
- 15 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 20 °C durante un minuto.



PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si no se procede de manera inmediata a la agrupación de bibliotecas y la consiguiente secuenciación en MiSeqDx, almacene la placa SGP sellada a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C hasta tres días.

Agrupación de bibliotecas

Preparación para agrupación de bibliotecas

- 1 Caliente un bloque de calor apto para tubos de centrifuga de 1,5 ml a 96 °C.
- 2 En una hielera, prepare un baño de agua con hielo. Enfríe el tampón de dilución de biblioteca en el baño de agua con hielo.
- 3 Empiece a descongelar el cartucho de reactivo de MiSeqDx.

Preparación de una dilución nueva de NaOH

**PRECAUCIÓN**

El uso de una solución nueva de NaOH diluida es esencial para desnaturalizar completamente las muestras para la generación de grupos en MiSeqDx.

- 1 Combine los volúmenes siguientes en un tubo de microcentrífuga:
 - Agua de laboratorio (900 μ l)
 - Preparado de NaOH 1,0 N (100 μ l)
- 2 Invierta el tubo varias veces para mezclar.

Desnaturalización y dilución de control interno PhiX

- 1 Combine los siguientes volúmenes para diluir la biblioteca de control interno PhiX a 2 nM:
 - Biblioteca de control interno PhiX de 10 nM (2 μ l)
 - 1 tampón TE (8 μ l)
- 2 Combine los siguientes volúmenes para que dé como resultado una biblioteca de control interno PhiX de 1 nM:
 - Biblioteca de control interno PhiX de 2 nM (10 μ l)
 - NaOH 0,1 N (10 μ l)
- 3 Agite brevemente para mezclar la solución de la biblioteca de control interno PhiX de 1 nM.
- 4 Centrifugue la solución de plantilla a $280 \times g$ a $20^\circ C$ durante un minuto.
- 5 Incúbela durante 4,5 minutos a temperatura ambiente para desnaturalizar la biblioteca de control interno PhiX en cadenas individuales.
- 6 Añada el siguiente volumen de tampón de dilución de biblioteca previamente refrigerado en el tubo que contiene la biblioteca de control interno PhiX desnaturalizada para obtener una biblioteca de control interno PhiX de 20 pM.
 - Biblioteca de control interno PhiX desnaturalizada (20 μ l)
 - tampón de dilución de biblioteca enfriado previamente (980 μ l)

Preparación del cartucho de reactivo

- 1 Descongele el cartucho de reactivo de MiSeqDx del ensayo de 139 variantes de FQ con un baño de agua con suficiente agua desionizada a temperatura ambiente como para sumergir la base del cartucho de reactivo hasta la línea de agua impresa en este. Tenga en cuenta que el agua no debe sobrepasar la línea de nivel máximo de agua.
- 2 Descongele el cartucho de reactivo en el baño de agua a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora o hasta que se haya descongelado por completo.
- 3 Saque el cartucho del baño de agua y dé unos suaves toques en la mesa para que el agua salga de la base del cartucho. Seque la base del cartucho. Asegúrese de que no haya salpicaduras de agua en la parte superior del cartucho de reactivo.

Inspección del cartucho de reactivo

- 1 Invierta el cartucho de reactivo diez veces para mezclar los reactivos descongelados y, a continuación, compruebe visualmente que todas las posiciones estén descongeladas.

**NOTA**

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

- 2 Inspeccione visualmente el reactivo de la posición 1 para asegurarse de que se haya mezclado completamente y no presente precipitados.
- 3 Golpee suavemente el cartucho en la mesa para reducir las burbujas de aire en los reactivos.

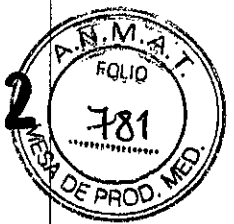
Enero de 2014

Lic. Alejandro Díez
Apodado
BioSystems S.A.

N.º pieza 15038347 Rev. 1.0 2/1

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



NOTA

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

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

Preparación de muestras para secuenciación

- Deje que el tampón de dilución de biblioteca alcance la temperatura ambiente. Agite el tampón de dilución de biblioteca y asegúrese de que todos los precipitados se hayan disuelto por completo.
- Si la placa **SGP** se ha almacenado congelada, descongéla a temperatura ambiente.
- Centrifugue la placa **SGP** a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- Disponga un tubo Eppendorf nuevo (en adelante, tubo **PAL**).
- Determine las muestras que se deben agrupar para la secuenciación. Es posible agrupar un máximo de 48 muestras para su secuenciación.
- Si la placa **SGP** se ha almacenado congelada, mezcle cada biblioteca que se deba secuenciar pipeteando arriba y abajo entre tres y cinco veces.
- Transfiera 5 µl de cada biblioteca que se deba secuenciar de la placa **SGP**, columna por columna, a una gradilla de ocho tubos de PCR. Selle la placa **SGP** con un sello adhesivo para placas y resérvela.



NOTA

Tras su uso, almacene la placa **SGP** sellada a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C. La placa **SGP** sellada permanece estable hasta tres días.

- Combine y transfiera el contenido de la gradilla de ocho tubos de PCR al tubo **PAL**. Mezcle bien el tubo **PAL**.
- Disponga un tubo Eppendorf nuevo (en adelante, tubo **DAL**).
- Añada 585 µl de tampón de dilución de biblioteca al tubo **DAL**.
- Añada 6 µl de 20 pM de control interno PhiX al tubo **DAL**. Pipetee arriba y abajo entre tres y cinco veces para enjuagar la punta y garantizar una transferencia completa.
- Transfiera 9 µl de **PAL** al tubo **DAL** que contiene tampón de dilución de biblioteca. Pipetee arriba y abajo entre tres y cinco veces para enjuagar la punta y garantizar una transferencia completa.
- Mezcle la **DAL** agitando el tubo tan rápido como pueda.
- Centrifugue el tubo **DAL** a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- Incube el tubo **DAL** en un bloque de calor a 96 °C durante dos minutos.
- 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.
- Mantenga el tubo **DAL** en el baño de agua con hielo durante cinco minutos.

Carga de bibliotecas de muestras en cartuchos

- Utilice una punta de pipeta de 1 ml independiente, limpia y vacía para perforar el sello metálico situado por encima del depósito del cartucho de reactivo etiquetado como **Load Samples** (Carga de muestras).
- Pipetee 600 µl de las bibliotecas de muestra en el depósito **Load Samples** (Carga de muestras). Proceda con cuidado para evitar tocar el sello metálico al dispensar la muestra.
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.
- Continúe directamente con los pasos de configuración del experimento con la interfaz de Software operativo de MiSeq (MOS).

9442



Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx

Interpretación de resultados

- 1 El ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina se ha diseñado para detectar 139 variantes de CFTR, incluidas las recomendadas por la ACMG (Tabla 2).
- 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 que causan 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 MiSeqDx 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 tipo salvaje, 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.

- El resultado del genotipo es HET cuando se identifica una muestra como heterocigótica y se detectan alelos mutantes y salvajes para la muestra.
 - El resultado del genotipo es HOM cuando se identifica una muestra como homocigótica y solo se detecta el alelo mutante para la muestra.
 - Si no se detecta ninguna variante para una muestra, el informe indica No panel variants are detected (No se han detectado variantes del panel).
- 3 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.
 - 4 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 información sobre la variante. Esta muestra se deberá repetir.

Enero de 2014

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º pieza 15038347 Rev. A ESP. 23

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

- 5 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.
- 6 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 MiSeqDx de Illumina utilizando una extracción nueva de ADN para descartar la contaminación cruzada de la muestra.
NOTA: Se debe tener en cuenta la hebra retrasada del haplotipo cuando se detectan dos o más variantes.
- 7 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: la base de datos del CFTR2¹¹, el artículo de Sosnay¹³, las directrices de la ACMG de 2004¹ y la opinión del comité ACOG de 2011.²

Si desea obtener más 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 la *Guía del usuario de MiSeq Reporter* (n.º de referencia 15038356_ESP).

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.

- 1 **Controles positivos:** Se requiere una muestra de ADN de control positivo en cada experimento. La muestra de ADN de control positivo debe ser una muestra con características bien definidas y contar 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 nueva generación.¹⁸ La muestra de control positivo debe generar el genotipo esperado. 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 todo el ensayo desde la preparación de bibliotecas.
- 2 **Control negativo (sin muestra/sin ADN):** Se requiere el uso de un control negativo (sin muestra/sin ADN) 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 %, es posible que se haya producido contaminación durante el procesamiento del ensayo. El ensayo se considera erróneo y, por lo tanto, se debe repetir todo el ensayo desde la preparación de bibliotecas.
- 3 **Control salvaje:** Se recomienda una muestra de control de ADN salvaje en cada experimento. La muestra de control salvaje debe ser una muestra con características bien definidas que no contenga ninguna variante de CFTR. La muestra de control salvaje 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 todo el ensayo desde la preparación de bibliotecas.
- 4 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.
- 5 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

Precisión

La precisión del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina 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 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.

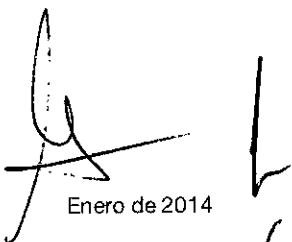
Los datos de este estudio se complementaron con datos de precisión de 68 muestras de estirpes celulares evaluadas en el estudio de reproducibilidad, 14 muestras clínicas del estudio analítico de evaluación de métodos de extracción y 52 muestras de plásmidos sintéticos. Los plásmidos sintéticos se diseñaron 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 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 salvajes 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. Se calculó la coincidencia total 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, según se identificó con los métodos de referencia.

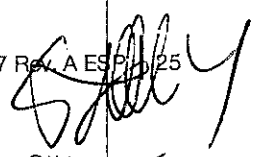
El ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina arrojó una coincidencia positiva en el nivel del genotipo del 100 %. La coincidencia negativa de todas las posiciones de la cepa salvaje fue superior al 99,99 % y la coincidencia total de todas las posiciones conocidas fue superior al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



Enero de 2014

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

N.º pieza 15038347 Rev. A ESP 02/25



Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

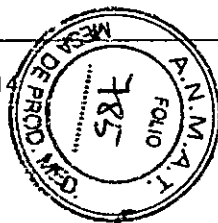
Lio Alejandro Diez
Apodado
Biosystems S.A.

Tabla 15 Precisión global del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Nombre de ADNc	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (cepa salvaje)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia 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>A	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.531delT	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100

9442

Dra. SILVINA ZANETTI
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

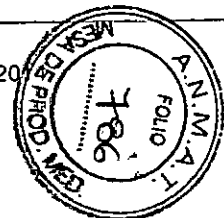


Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

Lic. Alejandro Díez
 Apoyado
 Biosystems S.A.

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Nombre de ADNc	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (cepa salvaje)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas						
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
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

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



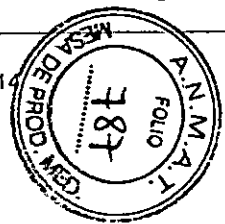
9442

Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

Lic. Alejandro Diez
 Apodado
 Biosystems S.A.

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Nombre de ADNc	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (cepa salvaje)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas						
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

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



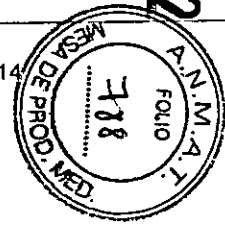
9442

Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

Lic. Alejandro Díez
 Apoderado
 Biosystems S.A.

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Nombre de ADNc	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (cepa salvaje)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas						
1812-1 G>A	SNV	c.1680-1G>A	500	0	2	0	498	0	0	100	100	100
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_053insA	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

Dra. SILVINA ZANELLA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



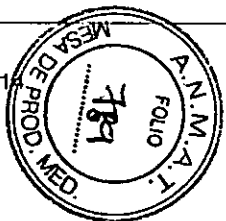
9442

Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

Lic. Alejandro Díez
Apodado
Biosystems S.A.

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Nombre de ADNc	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (repa salvaje)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas						
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
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+12191C>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

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



9442

Lic. Alejandro Díez
 Apodóntea
 Biosystems S.A.

Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Nombre de ADNc	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (cepa salvaje)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas						
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 ^s	DEL	c.3964-78_ 4242+577del	500	1	0	1	498	1 ^s	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>T	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

Dr. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



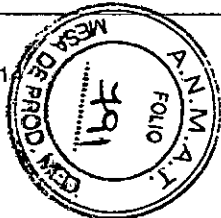
9 4 4 2

Lic. Alejandro Díez
 Director de
 Biosystems S.A.

Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Nombre de ADNc	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (cepa salvaje)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas						
H199Y	SNV	c.595C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
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_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

Dra. SILVINA ZANELLA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



9662

Biosystems S.A.

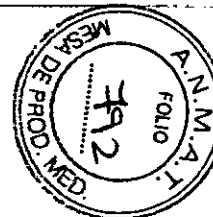
Lidia Alejandro Diez
Asesoradora

Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Nombre de ADNc	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (cepa salvaje)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas						
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
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+1.6kb A>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

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9 6 6 2



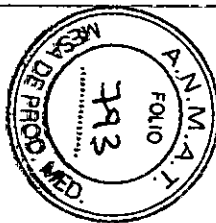
Lic. Alejandro Díez
Apoderado
Biosystems S.A.

Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Nombre de ADNc	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (cepa salvaje)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas						
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

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442

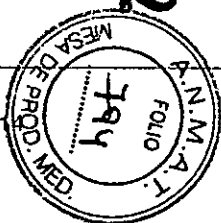


Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

Lic. Alejandro Díez
 Responsable de
 Biosystems S.A.

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Nombre de ADNc	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (cepa salvaje)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas						
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
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_3 885insT	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 ^c	Poli-TG Poli-T	c.1210-12T [5_9]	19	17	2	0	0	0	0	100	N/A	100
1506V ^c	SNV	c.1516A>G	1	0	0	0	1	0	0	N/A	100	100

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



9662

Lic. Alejandro Diez
 Adoradoro
 BIOSYSTEMS S.A.

Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Nombre de ADNc	Llamadas totales por variante	Llamadas positivas (variantes)			Llamadas negativas (cepa salvaje)	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
				Muestras clínicas	Muestras de estirpe celular	Muestras sintéticas						
I507V ^a	SNV	c.1519A>G	1	0	0	0	1	0	0	N/A	100	100
F508C ^b	SNV	c.1523T>G	1	0	0	0	1	0	0	N/A	100	100
Total			67 522		557		66 965	1	0	100	>99,99	>99,99

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

^a 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.

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

^c 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.

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

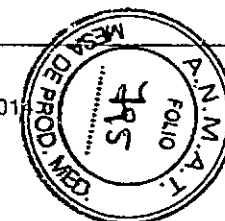
^e En el caso de una variante F508del homocigótica, se notificaron de forma adicional tres bases salvajes más (las variantes I506V, I507V y F508C) que no se identificaron en la muestra.

Tabla 16 Precisión del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx 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 ausencia 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

9 6 6 2

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

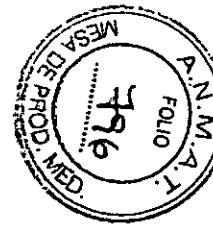


Lic. Alejandro Diez
 Apodado
 Biosystems S.A.

Tabla 17 Precisión del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx para las variantes de 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 ausencia de llamadas*	% de 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
(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

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



9642

Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

Lic. Alejandro Diez
 Responsable
 Biosystems S.A.

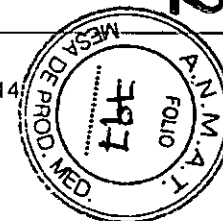
Genotipo de Poli-TG/Poli-T	N.º de muestras clínicas	N.º de muestras de estirpe celular	N.º de muestras sintéticas	N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas*	% de precisión
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9^	2	1	0	3^	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	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 todas 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.

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



9662

Lid. Alejandro Diez
 Poderado
 Biosystems S.A.

Reproducibilidad

La reproducibilidad del sistema de fibrosis quística MiSeqDx 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 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 entrada principal del flujo de trabajo de ensayo.

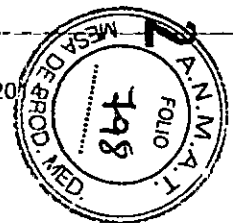
El índice de muestra de paso, definido como el número de muestras que superan los criterios de control de calidad en el primer intento, fue del 99,9 %.

La coincidencia positiva en el nivel del genotipo de todas las variantes fue del 99,77 %. La coincidencia negativa de todas las posiciones de WT 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 18 Reproducibilidad del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx

Pa- nel	N° de mue- stra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (cepa salvaje)			N° de llamadas incorec- tas	N° de ausencia de llama- das	Coinci- dencia positiva (%)	Coinci- dencia negativa (%)	Coinci- dencia 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	1507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

DR. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



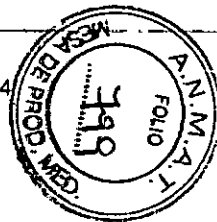
9442

Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

Lic. Alejandro Diez
 Apodante
 Biosystems S.A.

Pa- nel	N.º de mue- stra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (cepa salvaje)			N.º de llamadas incorec- tas	N.º de ausencia de llama- das	Coinci- dencia positiva (%)	Coinci- dencia negativa (%)	Coinci- dencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
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
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

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



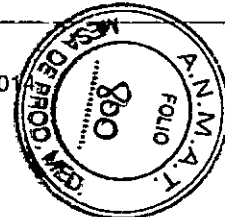
9
6
6
2

Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

Pa- nel	N.º de mue- stra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (cepa salvaje)			N.º de llamadas incorec- tas	N.º de ausencia de llama- das	Coinci- dencia positiva (%)	Coinci- dencia negativa (%)	Coinci- dencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	20	G85E/621+IG>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 141421
BIOSYSTEMS S.A.



9442

Pa- nel	N.º de mues- tra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (cepa salvaje)			N.º de llamadas incorec- tas	N.º de ausencia de llama- das	Coinci- dencia positiva (%)	Coinci- dencia negativa (%)	Coinci- dencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
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/(TC)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



974

Lic. Alejandro Díez
 Responsable
 Biosystems S.A.

Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

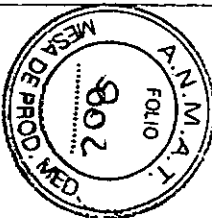
Panel	N.º de muestra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (cepa salvaje)			N.º de llamadas incorrectas	N.º de ausencia de llamadas	Coincidencia positiva (%)	Coincidencia negativa (%)	Coincidencia total (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
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

9762

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

N.º pieza 15038347 Rev. A ESP

Enero de 2014



Lic. Alejandro Díez
 Responsable
 Biosystems S.A.

Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

Pa- nel	N.º de mues- tra	Genotipo de muestra	Variantes	Llamadas totales por centro	Llamadas coincidentes positivas (variantes)			Llamadas coincidentes negativas (cepa salvaje)			N.º de llamadas incorec- tas	N.º de ausencia de llama- das	Coinci- dencia positiva (%)	Coinci- dencia negativa (%)	Coinci- dencia total (%)
					Cent- tro 1	Cent- tro 2	Cent- tro 3	Cent- tro 1	Cent- tro 2	Cent- tro 3					
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	72s	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1s	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75^	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

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TECNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



9642

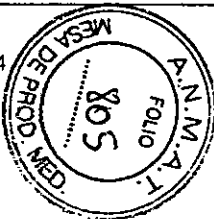
Dr. Alejandro Diez
Apodaca
BioSystems S.A.

Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

- ** 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.

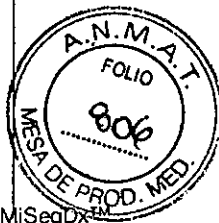
Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 141421
BIOSYSTEMS S.A.

Silvina Zanela



7 4 4 2 9 4 7 6

9442



Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeq Dx

Tabla 19 Información complementaria sobre las variantes del estudio de reproducibilidad

Variante (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
1078delIT	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

Enero de 2014

Lic. Alejandro Diez
 Responsable
 BioSystems S.A.

N.º pieza 15038747 Rev. 2 ESP 147

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

Variante (nombre común)	Tipo de variante	Región del gen de CFTR
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
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 deleción/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 las muestras total para cada método de extracción de este estudio fue de 168 (14

Lic. Alejandro Díez
 Apoderado
 BioSystems S.A.

Febrero de 2014
 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

muestras x 2 operadores/método de extracción x 3 experimentos/operador x 2 duplicados/muestra de ADN_g extraída).

Método de extracción	Número de muestras analizadas	Índice de llamada	Precisión	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 superior al 99 % en el primer experimento.

Entrada de ADN

El rango de entrada de ADN del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina 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.

Los resultados indican que el ensayo de 139 variantes de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina 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 sistema de fibrosis quística MiSeqDx de Illumina, 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 MiSeqDx 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 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 %.

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

Enero de 2014

Lic. Alejandro Díez
Operador
BioSystems S.A.

N.º pieza 15038347 Rev. A ESF | 49

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

8442

Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

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 %

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 8 muestras de ADN únicas para verificar la capacidad del ensayo de realizar una llamada de genotipado homogénea para una muestra determinada con combinaciones de cebadores de índice distintas. Cada muestra se analizó 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.

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, Sternan 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, Sternan 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 Garry 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. *Nat Genet.* 25 de agosto [publicación electrónica antes de impresión].
- 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. (May 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 registradas

Este documento y su contenido son propiedad de Illumina, Inc. y sus afiliados ("Illumina") y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes en conexión con el uso de los productos descritos en él y no para ningún otro fin. Este documento y su contenido no se utilizarán ni distribuirán con ningún otro fin ni tampoco se 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 ni similares derechos de terceros.

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

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

ILLUMINA NO ASUME RESPONSABILIDAD ALGUNA QUE SURJA DEL USO INCORRECTO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS LAS PIEZAS O EL SOFTWARE) NI DEL USO DE DICHOS PRODUCTOS FUERA DEL ÁMBITO DE LAS LICENCIAS EXPRESAS ESCRITAS O LOS PERMISOS OTORGADOS POR ILLUMINA EN CONEXIÓN CON LA ADQUISICIÓN DE DICHOS PRODUCTOS POR PARTE DE LOS CLIENTES.

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

© 2012-2014 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Illumina y MiSeqDx son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de Illumina, Inc. Todas las demás marcas y nombres mencionados en el presente documento pertenecen a sus respectivos propietarios.

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

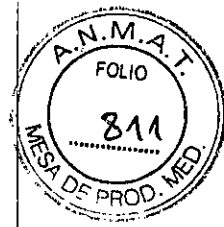
Enero de 2014

Lic. Alejandro Diéz
 Autorizada
 BioSystems S.A.

N.º pieza 15038347 Rev. A ESP | 51

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Ensayo de 139 variantes de la fibrosis quística MiSeqDx™

Información de contacto



Illumina
San Diego, 92122 California (EE. UU.)
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuera de Norteamérica)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH La Haya
Países Bajos



Etiquetado de productos

Consulte la leyenda de los símbolos que se proporciona con cada kit para obtener información completa sobre los símbolos que pueden aparecer en el embalaje o el etiquetado de los productos.

52 | N.º pieza 15038347 Rev. A ESP

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

Enero de 2014
Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



MiSeqDX Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay (DX-102-1001)

Proyecto de Rótulo Externo

Caja 1



MiSeqDX[®] Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay **1/5**

REF 15035429	CP Clinical Sequencing Assay - Oligo Pool	1 x 600 uL
LOT 1234567890	Hybridization Buffer	1 x 4.37 mL
REF 15035429	Extension-Ligation Mix	1 x 4.8 mL
REF 15035429	Index Primers C(A503) D(A504) E(A505)	1 x 187 uL
REF 15035429	Index Primers 1(A701) 2(A702) 10(A710)	1 x 128 uL
REF 15035429	PCR Polymerase	1 x 60 uL
REF 15035429	PCR Master Mix	1 x 2.8 mL
REF 15035429	Library Normalization Diluent	1 x 4.8 mL
REF 15035429	Library Dilution Buffer	1 x 4.5 mL
REF 15035429	PhiX Internal Control	1 x 10 uL

Patent: illumina.com/patents
Label PH: 1503802.C

illumina

www.illumina.com

illumina

1/5

MiSeqDX[®] Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

0001/01/01

LOT 1234567890

REF 15035429

-25°C
-15°C



MiSeqDX[®] Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay **1/5**

REF 15035429

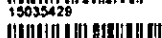
LOT 1234567890

48

0001/01/01

illumina, Inc.
1200 Barnes Way
San Diego, CA 92177 USA

EMERGE Europe
Moentstraat 15
2513 BH The Hague
The Netherlands



1234567890



RGT3109600

-25°C
-15°C



Rx Only



Label PH: 1503802.C

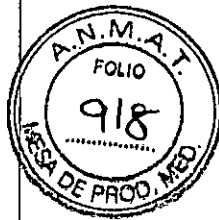
illumina

www.illumina.com

[Handwritten signature]
Lic. Alejandro Diez
Annelodo
BioSystems S.A.

[Handwritten signature]
Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Importado por:
BioSystems S.A
 Domicilio: Av. Dorrego 673
 Tel. 54-011-4854-7775
 Directora Técnica: Farm. Silvina Zanela
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:

Proyecto de Rótulo Internos

Caja 1 A

illumina

0001/01/01

LOT 1234567890

REF 15038248

Clinical Sequencing Assay

MiSeqDx® Cystic Fibrosis

1A

-25°C

-15°C

MiSeqDx® Cystic Fibrosis
Clinical Sequencing Assay **1A**

Pre-AMP

REF 15038248

LOT 1234567890

48

0001/01/01

illumina

www.illumina.com

illumina

MiSeqDx® Cystic Fibrosis **1A**

139-Variant Assay

OX COP	CF 139-Variant Assay Oligo Pool	1 x 600 uL	
OX OH31	Hybridization Buffer	1 x 4.32 mL	
OX FLMP	Extension-Ligation Mix	1 x 4.8 mL	
OX A501	OX A502	Index Primers A(A501) - H(A502)	1 x 182 uL
OX A701	OX A712	Index Primers I(A701) - J(A712)	1 x 128 uL
OX TOP1	PCR Polymerase	1 x 66 uL	
OX PMW2	PCR Master Mix	1 x 2.8 mL	

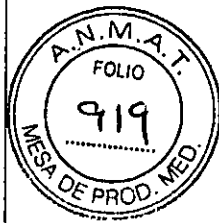
Patent www.illumina.com/patents
 Label PN: 16C42137.C

illumina
 www.illumina.com


[Signature]
 Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 BioSystems S.A.

[Signature]
 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TECNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.


0442




- Cebadores de índice

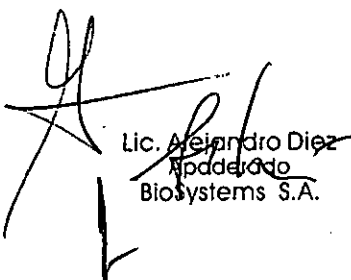

 DX2000016 - A503
 illumina
 Index Primer C (A503)
 REP 15035451
 LOT 9878543
 192 UL
 0001/01/01
 -25°C
 IVD CE
 Label PN: 15036585 A

- Cebadores de índice 1


 DX2000019 - A701
 illumina
 Index Primer 1 (A701)
 REP 15035457
 LOT 9878543
 128 UL
 0001/01/01
 -25°C
 IVD CE
 Label PN: 15036592 A

-Tampón de hibridación


 DX2003854 - OHS1
 Hybridization Buffer
 REP 15035442
 LOT 1234567890
 4.32 mL
 0001/01/01
 illumina, Inc.
 San Diego, CA 92122 USA.
 Label PN: 15036681.C
 -25°C
 IVD CE
 illumina


 Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 Biosystems S.A.


 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TECNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9642



-Mezcla de extensión-ligadura

DX2003893 - ELM3
Extension-Ligation Mix

REF 15035445
LOT 1234567890
4,8 mL
0001/01/01

illumin^a, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15038882.C

illumin^a

-15°C
-25°C

MD CE

-Mezcla Maestra de PCR

DX2003985 - PMM2
PCR Master Mix

REF 15035448
LOT 1234567890
2,8 mL
0001/01/01

illumin^a, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15038607.B

illumin^a

-15°C
-25°C

MD CE

-Grupo de oligonucleótidos del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística

illumin^a
CF Clinical Seq Assay
Oligo Pool

REF 15034400
LOT 1234567
600 uL
0001/01/01

illumin^a, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15035505.B
Patent www.illumina.com/patents

illumin^a

-15°C
-25°C

MD CE

-Polimerasa de PCR

illumin^a
PCR Polymerase

REF 15035469
LOT 9876543
56 uL
0001/01/01

illumin^a, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15038806.A

illumin^a

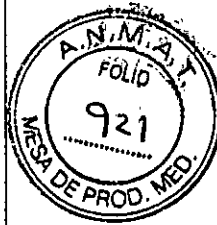
-15°C
-25°C

MD CE

Lic. Alejandro Diez
Agodo, Odo
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Caja 1 B



MiSeqDx® Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay 1B

DX LNA1	Library Normalization Diluent	1 x 4.6 mL
DX NT1	Library Dilution Buffer	1 x 4.6 mL
DX FX1	PhiX Internal Control	1 x 10 uL

illumina

Label PN: 15038830.C

www.illumina.com

illumina

REF 15038249
 LOT 1234567890
 0001/01/01
 -25°C
 -15°C
 MiSeqDx® Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay
 1B



MiSeqDx® Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay 1B

Post-AMP

REF 15038249
 LOT 1234567890
 48
 0001/01/01
 -25°C
 -15°C
 EC REP
 IVD
 illumina

Label PN: 15038830.C

www.illumina.com

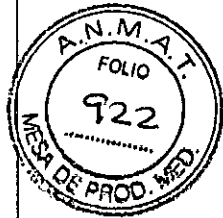
-Diluyente de normalización de biblioteca

DX2003274 - LNA1
 Library Normalization Diluent
 REF 15036473
 LOT 1234567890
 4.6 mL
 0001/01/01
 -25°C
 -15°C
 IVD CE
 illumina

Lic. Alejandro Diez
 Poderado
 BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TECNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



-Tampón de dilución de biblioteca

DX2004625 - HT1
Library Dilution Buffer

REP 15035475
LOT 1234567890

4.5 mL

0001/01/01

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15038810.B

-15°C
-25°C

illuminat

-Control interno PhiX

illumina
PhiX Internal Control

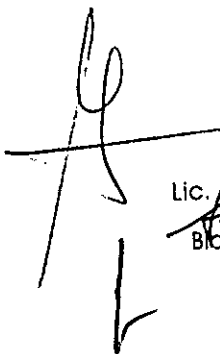
REP 15035574
LOT 0876543

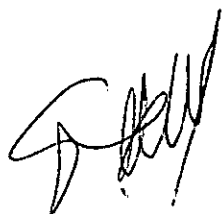
10 uL

0001/01/01

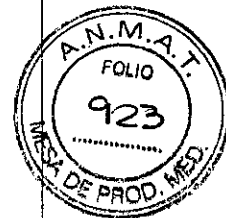
illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15039511.A

-15°C
-25°C


Lic. Alejandro Diez
Moderador
BioSystems S.A.


Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Proyecto de Rótulo Externo

Caja 2

illumina

0001/01/01

LOT 1234567890

REF 15035436

MiSeqDx® Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

2/5

MiSeqDx® Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay 2/5

REF 15035436

LOT 1234567890

48

0001/01/01

illumina, Inc.
5700 Flamingo Way
San Diego, CA 92122 USA

Emergo Europe
Moensstraat 15
2513 BH The Hague
The Netherlands

CE

Rx Only

IVD

Label PN: 16038070.C

illumina
www.illumina.com

MiSeqDx® Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay 2/5

MiSeqDx® Reagent Cartridge - CF
Cistricid Sequencing Assay

8 x 1

illumina

www.illumina.com

Importado por:
BioSystems S.A
 Domicilio: **Av. Dorrego 673**
 Tel. **54-011-4854-7775**
 Directora Técnica: **Farm. Silvina Zanela**
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:

[Signature]
 Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 BioSystems S.A.



[Signature]
 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Proyecto de Rótulo Interno

-Cartucho de reactivo


DX2450375 – CFDX
 MiSeqDx® Cartridge
 CF Clinical Sequencing Assay
 REF 15033611 
 LOT 1234667890 15033611
 0001/01/01 
 Illumina, Inc.
 San Diego, CA 92122 USA
 Label PN: 15037188.C

-25°C \rightarrow -15°C
 IVD CE
 illumina

Proyecto de Rótulo Externo

Caja 3



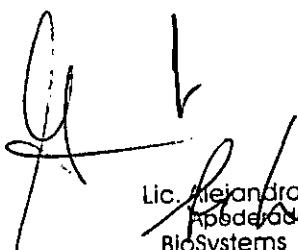
MiSeqDx® Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay **3/5**

CF1201	Elucent Wash Buffer	1 x 24 mL
CF1202	Universal Wash Buffer	1 x 4.8 mL
CF1203	PCR Clean Up Beads	1 x 5 mL
CF1204	Library Normalization Wash	2 x 4.8 mL
CF1205	Library Beads	1 x 1.2 mL
CF1206	MiSeqDx® Flow Cell-CT Clinical Sequencing Assay	6 x 1

illumina

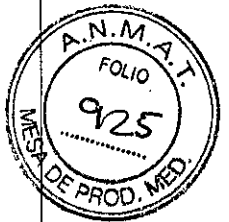
Label PN: 15037188.C

www.illumina.com


 Lic. Alejandro Diez
 Responsable
 BioSystems S.A.


 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



illumina
 0001/01/01
 LOT 1234567890
 REF 15035430
 Clinical Sequencing Assay
 MiSeqDx® Cystic Fibrosis
 3/5
 2°C 8°C

MiSeqDx® Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay 3/5

REF 15035430

LOT 1234567890

48

0001/01/01

illumina, Inc.
 5200 Illumina Way
 San Diego, CA 92122 USA

Emergo Europe
 Moenstraat 15
 2513 BH The Hague
 The Netherlands



Rx Only



IVD

illumina
 www.illumina.com

Label PN: 1603071.C

Importado por:
BioSystems S.A
 Domicilio: **Av. Dorrego 673**
 Tel. **54-011-4854-7775**
 Directora Técnica: **Farm. Silvina Zanela**
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:

Proyecto de Rótulo Interno

Caja 3 A

illumina
 0001/01/01
 LOT 1234567890
 REF 15038250
 Clinical Sequencing Assay
 MiSeqDx® Cystic Fibrosis
 3A
 2°C 8°C

MiSeqDx® Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay 3A

Pre-AMP

REF 15038250

LOT 1234567890

48

0001/01/01

illumina, Inc.
 5200 Illumina Way
 San Diego, CA 92122 USA

Emergo Europe
 Moenstraat 15
 2513 BH The Hague
 The Netherlands



Rx Only



IVD

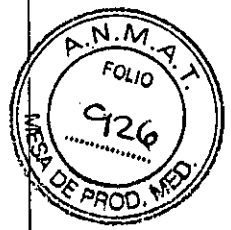
illumina
 www.illumina.com

Label PN: 1503071.C

[Signature]
 Lic. Alejandro Drez
~~Arlofero~~
 BioSystems S.A.

[Signature]
 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



MiSeqDx™ Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay 3A

REF SW1	Stringent Wash Buffer	1 x 24 mL
REF UB1	Universal Wash Buffer	1 x 4.8 mL

Label PN: 15038936.C **illumina** www.illumina.com

-Tampón de lavado restrictivo

DX200016 – SW1
Stringent Wash Buffer

REF 15035443
LOT 9876543
24 mL

0001/01/01 2°C 8°C IVD CE

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15036612.A **illumina**

- Tampón de lavado universal

DX2004524 – UB1
Universal Wash Buffer

REF 15035444
LOT 1234567890
4.8 mL

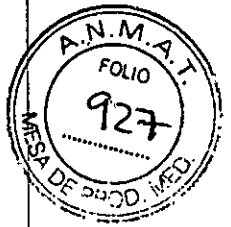
0001/01/01 2°C 8°C IVD CE

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15036613.B **illumina**

Alejandro Diez
Lic. Alejandro Diez
Aprobado
BidSystems S.A.

Silvina Zanela
Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Caja 3 B

illumina

0001/01/01

LOT 1234567890

REF 15038251

MiSeqDx® Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

3B

2°C 8°C

MiSeqDx® Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay 3B

Post-AMP

REF 15038251

LOT 1234567890

48

0001/01/01

4320 Shumway Way, San Diego, CA 92121 USA

Emurgo Europe, Rosenstraat 15, 2513 BH The Hague, The Netherlands

CE Rx Only IVD

Level Pk: 15038251.C

illumina®
www.illumina.com

MiSeqDx® Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay 3B

PCR Clean Up Beads	1 x 5 mL
Library Normalization Wash	2 x 4.8 mL
Library Beads	1 x 1.2 mL
MiSeqDx® Flow Cell-CF Clinical Sequencing Assay	6 x 1

illumina®
www.illumina.com

Level Pk: 15038251.C

[Signature]

Lic. Alejandro Díez
Biosystems S.A.

[Signature]

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



-Bolas de biblioteca

illumina
Library Beads

REF 15035447
LOT 9876543
1.2 mL 2°C 8°C
0001/01/01 IVD CE

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15036614.A

-Lavado de normalización de bibliotecas

DX2458172 - LNW1
Library Normalization Wash

REF 15036446
LOT 1234567890
4.8 mL 2°C 8°C
0001/01/01 IVD CE

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15036616.C

illumina

-Bolas de limpieza de PCR

DX2453692 - XFB
PCR Clean Up Beads
Manufactured by Beckman Coulter Inc

REF 15036674
LOT 1234567890
5 mL 2°C 8°C
0001/01/01 IVD CE

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15036676.B

illumina

-Celda de flujo

MiSeqDx® FlowCell-CF Clinical Sequencing Assay

REF 15033615 FC DX
SN 1234567890
2014/12/08 IVD CE
illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15036617.C

illumina

Lic. Alejandro Diez
Biosystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

0442



Proyecto de Rótulo Externo
Caja 4

illumina
0001/01/01
LOT 1234567890
REF 15036622
MiSeqDx® Cystic Fibrosis
Clinical Sequencing Assay
2°C
4/5

MiSeqDx® Cystic Fibrosis
Clinical Sequencing Assay 4/5

REF 15036622
LOT 1234567890
48
0001/01/01
illumina, Inc.
5300 Woking Way
San Diego, CA 92121 USA
Emergo Europe
Moostraat 15
2613 BH The Hague
The Netherlands
CE Rx Only IVD
www.illumina.com

Label PN: 15038078.C
illumina
www.illumina.com

MiSeqDx® Cystic Fibrosis
Clinical Sequencing Assay 4/5

ILL2251 MiSeqDx® SBS Sequencing (PE) CF
Clinical Sequencing Assay 6 x 353.1 mL

illumina
www.illumina.com

Lic. Alejandro Díaz
Apoderado
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



0442

Importado por:
BioSystems S.A
Domicilio: Av. Dorrego 673
Tel. 54-011-4854-7775
Directora Técnica: Farm. Silvina Zanela
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:

Proyecto de Rótulo Interno

-Solución SBS



DX2001711 - PR2

MiSeqDx® SBS Solution (PR2)
CF Clinical Sequencing Assay

REF 15033613



LOT 1234567

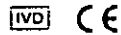


353.1 mL

0001/01/01

2°C

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA



Label PN: 15036616 C

illumina

Proyecto de Rótulo Externo

Caja 5

illumina

15°C

0001/01/01
LOT 1234567890
REF 15036623

S/S

MiSeqDx® Cystic Fibrosis
Clinical Sequencing Assay



MiSeqDx® Cystic Fibrosis
Clinical Sequencing Assay 5/5

REF 15036623



LOT 1234567890



48

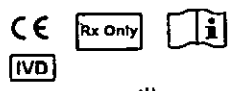


0001/01/01

15°C

illumina, Inc.
5200 Wetland Way
San Diego, CA 92121 USA

Emergo Europe
Blaarwijk 16
2615 SR The Hague
The Netherlands



Label PN: 15038078.C

illumina
www.illumina.com

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



9642

MiSeqDx® Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay 5/5

TC-220	TruSeq® Custom Amplicon Filter Plate	5 x 1
DL-EBT	Elution Buffer	1 x 4.8 mL
DL-LNS1	Library Storage Buffer	1 x 3.5 mL

illumina®
www.illumina.com

Label PN: 1803612.C

Importado por:
BioSystems S.A
 Domicilio: **Av. Dorrego 673**
 Tel. **54-011-4854-7775**
 Directora Técnica: **Farm. Silvina Zanela**
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:

Proyecto de Rótulo Interno

-Tampón de elución

DX2010987 – EBT
Elution Buffer

REF 15035474
 LOT 1234567890
 4.8 mL
 0001/01/01

Storage: 15°C → 30°C

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 18036808.B

illumina®

-Tampón de almacenamiento de biblioteca

DX2002794 – LNS1
Library Storage Buffer

REF 15035470
 LOT 1234567890
 3.5 mL
 0001/01/01

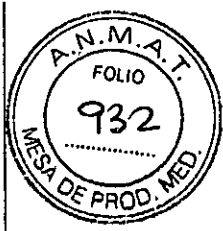
Storage: 15°C → 30°C

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 18036618.B

illumina®

[Signature]
 Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 BioSystems S.A.

[Signature]
 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TECNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



9442

-Placa del filtro

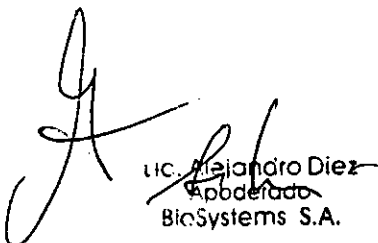
Filter Plate
For Pre-Amplification Use Only

REF 15026758

LOT 123456

69897A

illumina


Lic. Alejandro Diez
Abogado
BioSystems S.A.


Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

044



MiSeqDX Cystic Fibrosis 139-variant Assay (DX-102-1004; DX-102-1003)

Caja 1

Proyecto de Rótulo Externo

MiSeqDX[®] Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

CF 139-Variant Assay - Oligo Pool	1 x 400 µL
Hybridization Buffer	1 x 4.87 mL
Extension-4 Reaction Mix	1 x 4.8 mL
Index Primers A(A181)-H(A508)	1 x 192 µL
Index Primers NA701-(175A212)	1 x 128 µL
PCR Polymerase	1 x 66 µL
PCR Master Mix	1 x 2.8 mL
Library Normalization Diluent	1 x 4.4 mL
Library Dilution Buffer	2 x 4.1 mL
PCR Thermal Control	1 x 42 µL

1/5

www.illumina.com

illumina

0001/01/01

LOT 1234567

REF 15041293

MiSeqDX[®] Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

1/5

-25°C / -15°C

MiSeqDX[®] Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

1/5

REF 15041293

LOT 1234567

96

0001/01/01

CE R-Only i

IVD

illumina

www.illumina.com

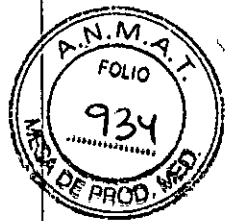
[Signature]

Lic. Alejandro Diez
Aboderada
BioSystems S.A.

[Signature]

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Importado por:
BioSystems S.A
 Domicilio: Av. Dorrego 673
 Tel. 54-011-4854-7775
 Directora Técnica: Farm. Silvina Zanela
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:

Proyecto de Rótulo Internos

Caja 1 A

illuminat

0001/01/01

LOT 1234567

REF 15041291

MiSeqDx® Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

1A

MiSeqDx® Cystic Fibrosis 139-Variant Assay 1A

Pre-AMP

REF 15041291

LOT 1234567

96

0001/01/01

CE REF

Energy Charge

Revised 12/2012

© 2012 Illumina, Inc.

illuminat

www.illumina.com

MiSeqDx® Cystic Fibrosis 139-Variant Assay 1A

CF 139-Variant Assay (Dry) Test	1 x 820 µL
Hybridization Buffer	1 x 420 µL
Base-Calligation Mix	1 x 420 µL
Probe Primers (2500) + (1000)	1 x 100 µL
Probe Primers (1000) + (2500)	1 x 100 µL
PCR Polymerase	1 x 80 µL
PCR Master Mix	1 x 2.0 mL

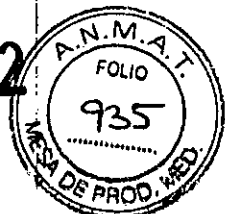
illuminat

www.illumina.com

Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TECNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



-Grupo de oligonucleótidos del ensayo de 139 variantes de fibrosis quística

illumina
 CF 139-Variant Assay
 Oligo Pool
 [REF] 15036699
 [LOT] 1234567
 600 uL -25°C
 0001/01/01
 Illumina, Inc.
 San Diego, CA 92122 USA
 Label PN: 15035507.B
 Patent www.illumina.com/patents

- Tampón de hibridación

DX27603228 - FLM3
 Hybridization Buffer
 [REF] 15035442
 [LOT] 1234567
 4.32 mL -15°C
 0001/01/01
 Illumina, Inc.
 San Diego, CA 92122 USA

-Mezcla de extensión-ligadura

DX27603078 - FLM3
 Extension-Ligation Mix
 [REF] 15035445
 [LOT] 1234567
 4.8 mL -15°C
 0001/01/01
 Illumina, Inc.
 San Diego, CA 92122 USA

-Mezcla Maestra de PCR

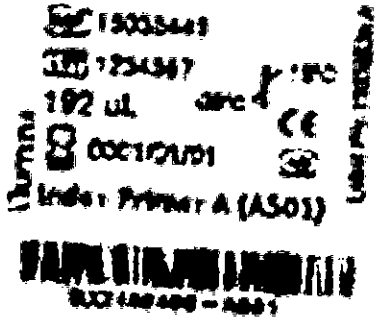
DX27603093 - FLM3
 PCR Master Mix
 [REF] 15035443
 [LOT] 1234567
 2.8 mL -15°C
 0001/01/01
 Illumina, Inc.
 San Diego, CA 92122 USA

[Signature]
 Lic. Alejandro Diez
 Autorizado
 BioSystems S.A.

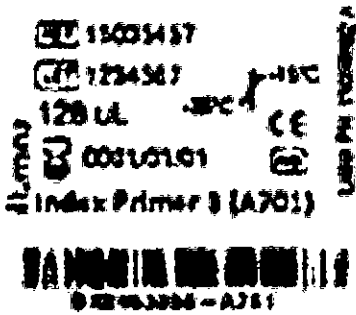
[Signature]
 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TECNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



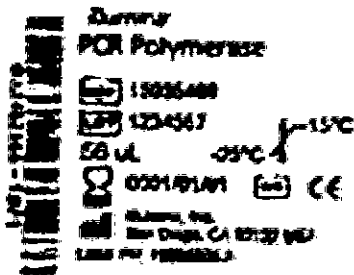
- Cebadores de índice



- Cebadores de índice 1



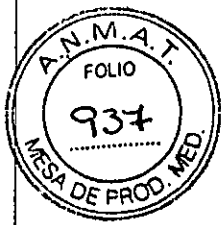
- Polimerasa de PCR



Lic. Alejandro Diez
Aboderado
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Caja 1 B

illumina®

0001/01/01

REF 15041292

LOT 1234567

-25°C

1B

MiSeqDx® Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

MiSeqDx® Cystic Fibrosis 139-Variant Assay 1B

Post-AMP

REF 15041292

LOT 1234567

98

0001/01/01

Store the MiSeqDx Assay at -25°C for Up to 6 Months

CE REF

Ro. Only

IVD

illumina®

Lab# PR-13041933-C

www.illumina.com

MiSeqDx® Cystic Fibrosis 139-Variant Assay 1B

QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN)	1 x 2.5 mL
QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN)	1 x 2.5 mL
QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN)	1 x 2.5 mL

illumina®

Lab# PR-13041933-C

www.illumina.com

[Signature]

Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 BioSystems S.A.

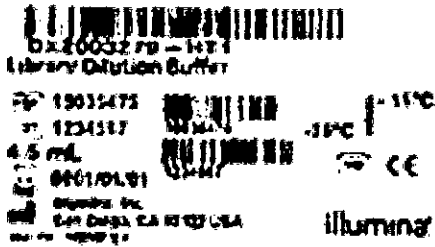
[Signature]

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TECNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

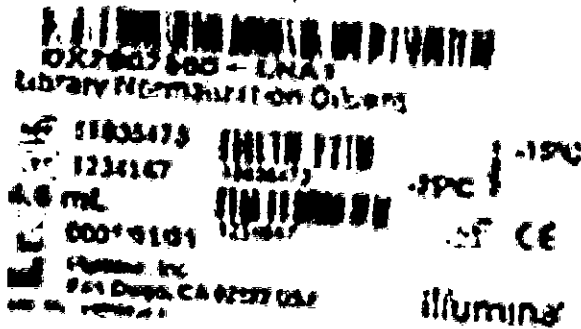
9442



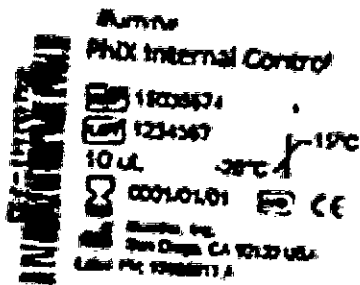
-Diluyente de normalización de biblioteca



-Tampón de dilución de biblioteca



-Control interno PhiX



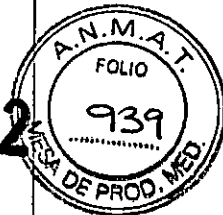
Handwritten signature and initials.

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

Handwritten signature.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9 4 4 2



Projeto de Rótulo Externo

Caja 2

Ilumina



0001/01/01
LOT 1234567
REF 15041294

2/5

MiSeqDx® Cystic Fibrosis
139-Variant Assay

MiSeqDx® Cystic Fibrosis
139-Variant Assay

2/5

REF 15041294



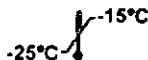
LOT 1234567



Σ 96

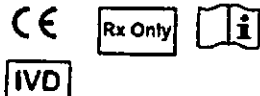


0001/01/01



Martina, Inc.
5700 Marlene Way
San Diego, CA 92122 USA

Emurgo Europe
Elostraat 18
2513 BH The Hague
The Netherlands



Label PN: 15041938.C

Ilumina®
www.illumina.com

MiSeqDx® Cystic Fibrosis
189-Variant Assay

2/5

MiSeqDx® Cystic Fibrosis 189-Variant Assay

Ilumina®

Label PN: 15041938.F

www.illumina.com

Lic. Alejandro Drez
Abogado
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

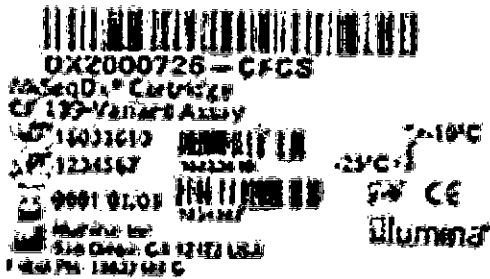
9442



Importado por:
BioSystems S.A
 Domicilio: Av. Dorrego 673
 Tel. 54-011-4854-7775
 Directora Técnica: Farm. Silvina Zanela
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:

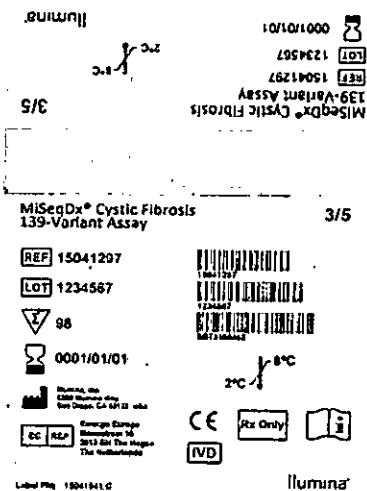
Proyecto de Rótulo Interno

- Reactivos de posamplificación de la caja 2
- cartucho



Proyecto de Rótulo Externo

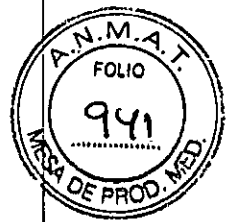
Caja 3



[Signature]
 Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 BioSystems S.A.

[Signature]
 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



MiSeqDx® Cystic Fibrosis 3/5
139-Variant Assay

0001	Deliver Wash Buffer	1 x 24 mL
0002	Deliver Wash Buffer	1 x 17 mL
0003	FCI Clean-Up Bead	1 x 1 mL
0004	Library Neutralization Wash	2 x 4.0 mL
0005	Library Bead	1 x 1.2 mL
0006	MiSeqDx® Reagent	2 x 1

illumina

Lot No. 15041295

www.illumina.com

Importado por:
BioSystems S.A
 Domicilio: **Av. Dorrego 673**
 Tel. **54-011-4854-7775**
 Directora Técnica: **Farm. Silvina Zanela**
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:

Proyecto de Rótulo Interno

Caja 3 A

illumina®
 0001/01/01
 LOT 1234567
 REF 15041295
 MiSeqDx® Cystic Fibrosis 3A
 139-Variant Assay 3A

MiSeqDx® Cystic Fibrosis 3A
 139-Variant Assay 3A

Pre-AMP
 REF 15041295
 LOT 1234567
 96
 0001/01/01

2°C / 8°C

CE
 IVD
 For Only

illumina®
 www.illumina.com

Lot No. 15041295

[Signature]
 Lic. Alejandro Diez
 Abogado
 BioSystems S.A.

[Signature]
 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TECNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

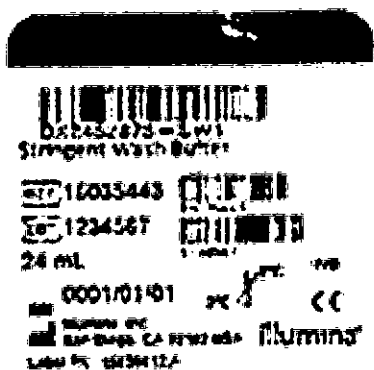
9442

MiSeq Dx[®] Cystic Fibrosis
180-Varianc Assay 3A

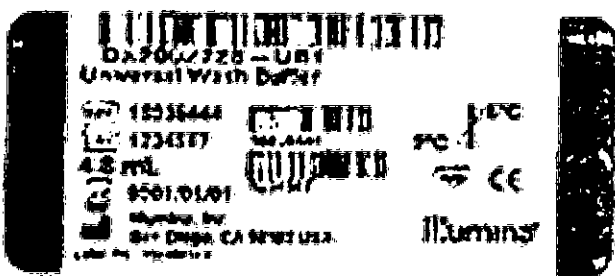
0001010101 Stringent Wash Buffer 1.0 mL
0001010101 Universal Wash Buffer 1.0 mL

www.illumina.com

-Tampón de lavado restrictivo



- Tampón de lavado universal



Lic. Alejandro Díez
Aboderada
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

944



Caja 3 B

illumina

REF 15041296
LOT 1234567
0001/01/01
2°C
1-8°C
3B
MiSeqDx® Cystic Fibrosis
139-Variant Assay



MiSeqDx® Cystic Fibrosis 3B
139-Variant Assay

Post-AMP

REF 15041296

LOT 1234567

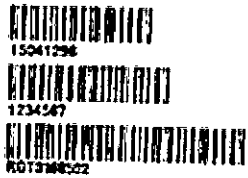
96

0001/01/01

Ampli, RT
4300 North 15th
San Diego, CA 92122 USA

George E. Feltz
Inventor of US
2513 EM The Hague
The Netherlands

Label No: 15041296.D



2°C
1-8°C
CE
Rx Only
IVD

illumina

www.illumina.com

MiSeqDx® Cystic Fibrosis 3B
139-Variant Assay

PCR	PCR Open Up-Prims	1 x 8 mL
Library	Library Amplification Wam	0 x 43 mL
Library	Library Kit	1 x 12 mL
Sequencing	Sequencing Run Kit	0 x 1

illumina

www.illumina.com

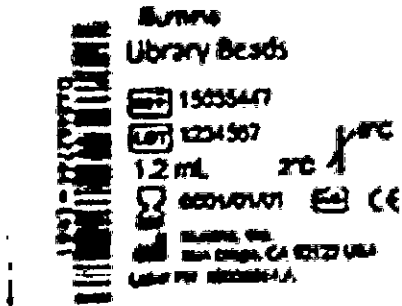
Lic. Alejandro Diez
Aboderado
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

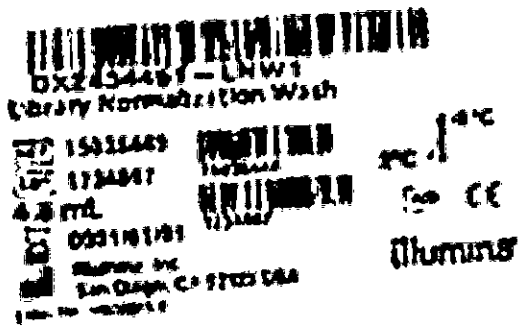
9442



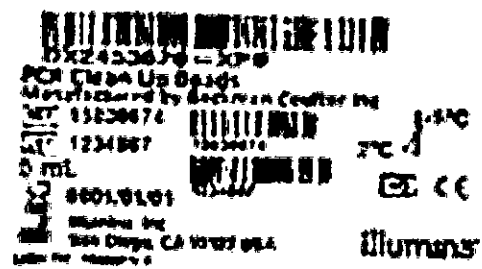
-Bolas de biblioteca



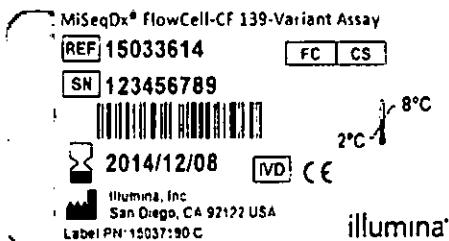
-Lavado de normalización de bibliotecas



-Bolas de limpieza de PCR



-Celda de flujo



Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Proyecto de Rótulo Externo
Caja 4

illumina

2°C
8°C

0001/01/01
1234567
15041298

MiSeqDx® Cystic Fibrosis
139-Variant Assay

4/5



MiSeqDx® Cystic Fibrosis
139-Variant Assay 4/5

REF 15041298



LOT 1234567



Σ 96

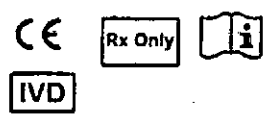


0001/01/01

2°C
8°C

illumina, Inc.
5200 Alvarado Way
San Diego, CA 92122 USA

EC REP Emergo Europe
Aloenstraat 15
2513 BH The Hague
The Netherlands



Label PN: 15041942.C

illumina
www.illumina.com

MiSeqDx® Cystic Fibrosis
139-Variant Assay 4/5

MiSeqDx® Cystic Fibrosis (CF) CR
139-Variant Assay 2 x 255 vials

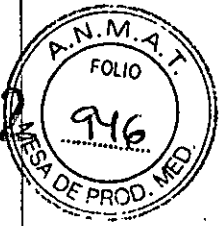
Label PN: 15041942.C

illumina
www.illumina.com

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Importado por:
BioSystems S.A
 Domicilio: **Av. Dorrego 673**
 Tel. **54-011-4854-7775**
 Directora Técnica: **Farm. Silvina Zanela**
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:

Proyecto de Rótulo Interno

- Reactivos de posamplificación de la caja 2
- Solución SBS



DX2001671 - PR2

MiSeqDx[®] SBS Solution (PR2)
CF 139-Variant Assay

[REF] 15033612



[LOT] 1234567



353.1 mL

0001/01/01

2°C \downarrow -8°C

ILLUMINA, INC.
San Diego, CA 92122 USA



LIBRARY 15033612 C

illumina

Proyecto de Rótulo Externo

Caja 5



MiSeqDx[®] Cystic Fibrosis 139-Variant Assay 5/5

[REF]	Index [®] Cystic Fibrosis Panel	2 x 1
[REF]	Index Buffer	1 x 40 mL
[REF]	Library Storage Buffer	1 x 55 mL

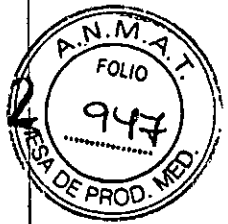
illumina

www.illumina.com

[Signature]
 Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 BioSystems S.A.

[Signature]
 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TECNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



illumina
 15°C - 30°C
 REF 15041299
 LOT 1234567
 0001/01/01
 MiSeqDx® Cystic Fibrosis
 139-Variant Assay
 5/5
 MiSeqDx® Cystic Fibrosis
 139-Variant Assay 5/5

REF 15041299
 LOT 1234567
 96
 0001/01/01
 Illumina, Inc.
 2700 Harbor Way
 San Diego, CA 92122 USA
 Emergo Europe
 Rosenstraat 11
 2513 BH The Hague
 The Netherlands
 CE Rx Only IVD

Label PN: 15041843.C

illumina
www.illumina.com

Importado por:
BioSystems S.A
 Domicilio: Av. Dorrego 673
 Tel. 54-011-4854-7775
 Directora Técnica: Farm. Silvina Zanela
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:

Proyecto de Rótulo Interno

-Tampón de elución

0X2002609 - EBT
 Elution Buffer
 REF 15035474
 LOT 1234567
 4.8 mL
 0581/01/01
 Illumina, Inc.
 2700 Harbor Way
 San Diego, CA 92122 USA
 CE
 illumina

[Signature]
 Lic. Alejandro Diez
 Apodado
 BioSystems S.A.

[Signature]
 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Proyecto de Rótulo Externo

Caja 1

illumina

REF 15039490
LOT 1234567
0001/01/01

MiSeqDx® Universal Kit 1.0

1/5

MiSeqDx® Universal Kit 1.0 1/5

REF 15039490
LOT 1234567
96
0001/01/01

Hybridize at 25°C for 120 min. For details, see 15039490 USA

CE Rx Only IVD

illuminat
www.illumina.com

MiSeqDx® Universal Kit 1.0 1/5

Hybridization Buffer	1 x 4.02 mL
Extension-Ligation Mix	1 x 4.8 mL
Index Primers A(A501)~(A508)	1 x 197 µL
Index Primers 1(A701)~12(A712)	1 x 120 µL
PCR Polymerase	1 x 50 µL
PCR Master Mix	1 x 2.8 mL
Library Normalization Diluent	1 x 4.8 mL
Library Dilution Buffer	1 x 4.6 mL
PhiX Internal Control	1 x 10 µL

illuminat
www.illumina.com

Lic. Alejandro Diez
Rodríguez
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Importado por:
BioSystems S.A
 Domicilio: Av. Dorrego 673
 Tel. 54-011-4854-7775
 Directora Técnica: Farm. Silvina Zanela
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:

Proyecto de Rótulos Internos

Caja 1 A

illumina

0001/01/01
 LOT 1234567
 REF 15039485

-25°C
 -15°C

1A
 MiSeqDx® Universal Kit 1.0

MiSeqDx® Universal Kit 1.0 **1A**

Pre-AMP
REF 15039485
LOT 1234567
 98
 0001/01/01

illumina, Inc.
 5200 Illumina Way
 San Diego, CA 92161 USA

CE **REP** **Emergency Europe**
Mobilitas 15
 2513 BH The Hague
 The Netherlands

CE **Rx Only** **IVD** **illumina**
www.illumina.com

Patent: www.illumina.com/patents
 Label P#: 15039485 C

[Signature]
 Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 BioSystems S.A.

[Signature]
 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TECNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



MiSeqDx® Universal Kit 1.0 1A

DX (GSI)	Hybridization Buffer	1 x 4.32 mL
DX (FLM)	Extension-Ligation Mix	1 x 4.8 mL
DX (A501) - DX (A601)	Index Primers A(A501) - (A601)	1 x 192 uL
DX (A701) - DX (A703)	Index Primers 1(A701) - 12(A712)	1 x 128 uL
DX (TDP1)	PCR Polymerase	1 x 66 uL
DX (Pur1)	PCR Master Mix	1 x 2.8 mL

Patent: www.illumina.com/patents
Label PN: 15035500

illumina
www.illumina.com

-Cebadores de índice

illumina
REF 15035449
LOT 9876543
 192 uL -25°C
 0001/01/01
CE
 Index Primer A (A501)
Label PN: 15036535 A

-Cebadores de índice 1

illumina
REF 15035459
LOT 9876543
 128 uL -25°C
 0001/01/01
CE
 Index Primer 3 (A703)
Label PN: 15036546 A

Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 BioSystems S.A.

[Signature]
 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TECNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



-Tampón de hibridación

DX2003854 - OHS1
Hybridization Buffer

REF 15035442
LOT 1234567890
4.32 mL

0001/01/01

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15036681.C

illumina

-Mezcla de extensión-ligadura

DX2003693 - ELM3
Extension-Ligation Mix

REF 15035445
LOT 1234567890
4.8 mL

0001/01/01

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15036682.C

illumina

-Polimerasa de PCR

illumina
PCR Polymerase

REF 15035469
LOT 9876543
56 uL

0001/01/01

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15036606.A

-Mezcla maestra de PCR

DX2003985 - PMM2
PCR Master Mix

REF 15036448
LOT 1234567890
2.8 mL

0001/01/01

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15036607.G

illumina

[Handwritten signature]
Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

[Handwritten signature]
Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Caja 1 B

illumina

0001/01/01

REF 15039488

LOT 1234567

-25°C

-15°C

MiSeqDx® Universal Kit 1.0 1B

MiSeqDx® Universal Kit 1.0 1B

Post-AMP

REF 15039488

LOT 1234567

96

0001/01/01

illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, CA 92121 USA

Emergo Europe
Moensstraat 15
2913 BH The Hague
The Netherlands

EC REP

CE Rx Only IVD

illumina®

www.illumina.com

Label PN: 15039509.C

MiSeqDx® Universal Kit 1.0 1B

OX LNA1	Library Normalization Diluent	1 x 4.6 mL
OX RT1	Library Dilution Buffer	1 x 4.6 mL
OX PFI	PhiX Internal Control	1 x 10 µL

illumina®

Label PN: 15036691.D

www.illumina.com

-Diluyente de normalización de biblioteca

DX2003274 - LNA1

Library Normalization Diluent

REF 15035473

LOT 1234567890

4.6 mL

0001/01/01

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA

Label PN: 15036609.B

illumina®

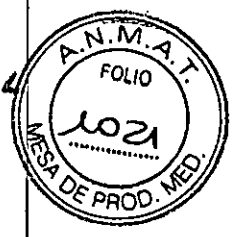
[Handwritten signature]

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

[Handwritten signature]

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

944



-Tampón de dilución de biblioteca

DX2004625 - HT1
Library Dilution Buffer

REF 15035475
LOT 1234567890
4.5 mL
0001/01/01

15°C
-25°C

IVD CE

illumina

illumin, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 18038810.8

-Control interno PhiX

PhiX Internal Control

REF 15038574
LOT 0676543
10 uL
0001/01/01

15°C
-25°C

IVD CE

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15000511.A

Proyecto de Rótulo Externo

Caja 2

MiSeqDx® Universal Kit 1.0 2/5

REF 15039492
LOT 1234567
96
0001/01/01

15°C
-25°C

IVD CE Rx Only i

illumina

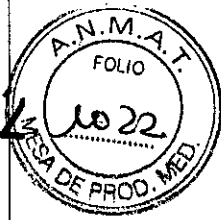
[Signature]

Lic. Alejandro Díez
Alcaldía
BioSystems S.A.

[Signature]

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



MiSeqDx® Universal Kit 1.0 2/5

REF. 15038508 MiSeqDx® Reagent Cartridge - 2 x 1 Universal Kit 1.0

Label PN: 15039582.B

illumina

www.illumina.com

Importado por:
BioSystems S.A
Domicilio: **Av. Dorrego 673**
Tel. **54-011-4854-7775**
Directora Técnica: **Farm. Silvina Zanela**
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:

Proyecto de Rótulos internos

-Cartucho

DX2000326 - MCUN
MiSeqDx® Cartridge
Universal Kit 1.0
REF. 15038508
LOT 1234567
0001/01/01
illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15038737.B

15038508
1234567
-25°C
-15°C
IVD CE
illumina

[Signature]
Lic. Alejandro Diez
A poder del
BioSystems S.A.

[Signature]
Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

944

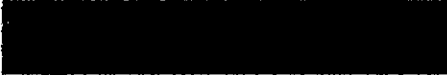


Proyecto de Rótulos Externos

Caja 3

Diagram

illumina
 0001/01/01
 1234567
 15039498
 MISEQDX® Universal Kit 1.0
 3/5



MiSeqDx® Universal Kit 1.0 3/5

REF 15039498
 LOT 1234567
 06
 0001/01/01
 illumina, inc.
 5000 Illumina Way
 San Diego CA 92121 USA
 CE REP
 IVD
 Rx Only
 illumina
 www.illumina.com



MiSeqDx® Universal Kit 1.0 3/5

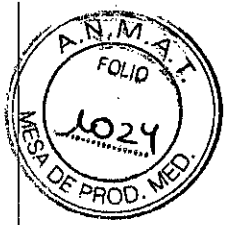
ES 1201	Stringent Wash Buffer	1 x 24 mL
ES 1202	Universal Wash Buffer	1 x 4.8 mL
ES 1203	PCR Clean Up Beads	1 x 5 mL
ES 1204	Library Normalization Wash	2 x 4.8 mL
ES 1205	Library Beads	1 x 1.2 mL
ES 1206	MiSeqDx® Flow Cell-Universal Kit 1.0	2 x 1

illumina
www.illumina.com

[Signature]
 Lic. Alejandro Diaz
 Andradó
 BioSystems S.A.

[Signature]
 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TECNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Importado por:
BioSystems S.A
 Domicilio: **Av. Dorrego 673**
 Tel. **54-011-4854-7775**
 Directora Técnica: **Farm. Silvina Zanela**
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:

Proyecto de Rótulo Interno

Caja 3 A

illumina®

10/101/01
REF 15039494
LOT 1234567

2°C / 8°C

MiSeqDx® Universal Kit 1.0 3A

MiSeqDx® Universal Kit 1.0 3A

Pre-AMP
REF 15039494

LOT 1234567

96

0001/01/01

illumina®

Label PN: 15039494.B

MiSeqDx® Universal Kit 1.0 3A

DX 101	Stringent Wash Buffer	1 x 24 mL
DX 102	Universal Wash Buffer	1 x 4.8 mL

Lic. Alejandro Diez
 Aboderado
 BioSystems S.A.

illumina®
 www.illumina.com

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TECNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



-Tampón de lavado restrictivo



DX2000016 - SW1
Stringent Wash Buffer

REF 15035443
LOT 9876543
24 mL
0001/01/01
illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15036612.A

-Tampón de lavado universal

DX2004524 - UB1
Universal Wash Buffer
REF 16035444
LOT 1234567890
4.8 mL
0001/01/01
illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 16036613.B

Caja 3 B



MiSeqDx® Universal Kit 1.0 3B

- PCR Clean Up Beads 1 x 6 mL
- Library Normalization Wash 2 x 4.8 mL
- Library Beads 1 x 1.2 mL
- MiSeqDx® Flow Cell- Universal Kit 1.0 2 x 1

illumina®

Label PN: 16039595.B

Lic. Alejandro Diez
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



illumina

2°C / 8°C

REF 15039498
LOT 1234567
EXP 0001/01/01

MiSeqDx® Universal Kit 1.0 3B



MiSeqDx® Universal Kit 1.0 3B

Post-AMP

REF 15039496

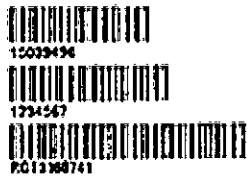
LOT 1234567

96

EXP 0001/01/01

illumina, Inc.
2355 Illumina Way
San Diego, CA 92161 USA

CE REP
Emergency Europe
Reparatur 10
2513 001 The Magpie
The Netherlands



2°C / 8°C

CE REP
Rx Only
IVD

illumina

Label P/N: 15039513 C

www.illumina.com

-Celda de flujo

MiSeqDx® Flow Cell-Universal Kit 1.0

REF 15038512 FC UN

SN 1234567890

EXP 2014/12/08 IVD CE

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA

Label P/N: 15044919 B

illumina

2°C / 8°C

Lic. Ajelando Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

-Bolas de biblioteca

illumina
Library Beads

DX2000007 - LNB1

REF 15035447
 LOT 9878543

1.2 mL 2°C 8°C

0001/01/01 IVI CE

illumina, Inc.
 San Diego, CA 92122 USA
 Label PN: 15036614.A

-Lavado de normalización de biblioteca

DX2458172 - LNW1
Library Normalization Wash

REF 15035446
 LOT 1234567890

4.8 mL 2°C 8°C

0001/01/01 IVI CE

illumina, Inc.
 San Diego, CA 92122 USA
 Label PN: 15036616.C

illumina

-Bolas de limpieza de PCR

DX2453692 - XPB
PCR Clean Up Beads
 Manufactured by Beckman Coulter Inc

REF 15036674
 LOT 1234567890

5 mL 2°C 8°C

0001/01/01 IVI CE

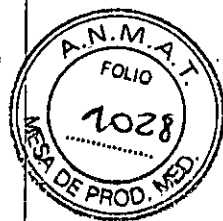
illumina, Inc.
 San Diego, CA 92122 USA
 Label PN: 15036678.B

illumina

[Signature]
 Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 BioSystems S.A.

[Signature]
 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

9442



Proyecto de Rótulo Externo

Caja 4

illumina
 10/10/1000
 1234567
 15039500
 MISeqDx® Universal Kit 1.0
 4/5

MISeqDx® Universal Kit 1.0 4/5

REF 15039500
 LOT 1234567
 96
 10/10/1000
 Illumina, Inc.
 2200 Illumina Way
 San Diego, CA 92122 USA
 CE Rx Only IVD
 Emergency Contact
 1-800-828-6886
 The Illumina Advantage
 Label PN: 15039514.C illumina®

MISeqDx® Universal Kit 1.0 4/5

MISeqDx® SAS Solution (P&S) 2 x 355.1 mL Universal Kit 1.0

illumina®
www.illumina.com

Lic. Alejandro Diez
A. Poderado
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

9442



Importado por:
BioSystems S.A
Domicilio: **Av. Dorrego 673**
Tel. **54-011-4854-7775**
Directora Técnica: **Farm. Silvina Zanela**
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:

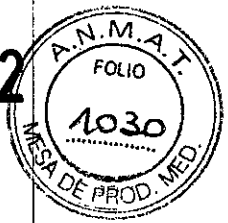
Proyecto de Rótulos Internos

DX2001750-PR2
MiSeqDx[®] SBS Solution (PR2)
Universal Kit 1.0
REF 15038510
LOT 1234567
353.1 mL
0001/01/01 2°C - 8°C
Illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
IVD CE
Label P/N: 15038510 0

Illumina

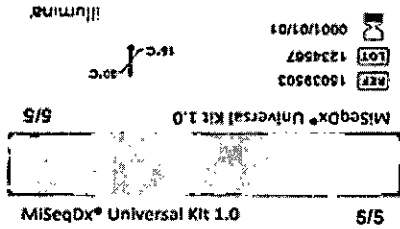
Lic. Alejandro Diéz
Apoderado
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

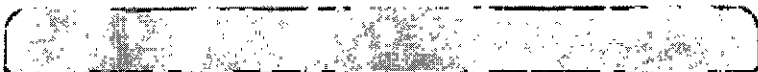
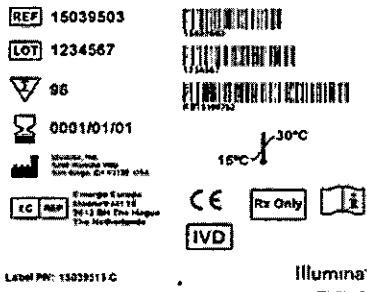


Proyecto de Rótulo Externo

Caja 5



MiSeqDx® Universal Kit 1.0 5/5



MiSeqDx® Universal Kit 1.0 5/5

	TruSeq® Custom Amplicon Filter Plate	2 x 5
	Eluon Buffer	1 x 4.8 mL
	Library Storage Buffer	1 x 3.5 mL

illumina®

Label PN: 15039511 C

www.illumina.com

Importado por:
BioSystems S.A
 Domicilio: **Av. Dorrego 673**
 Tel. **54-011-4854-7775**
 Directora Técnica: **Farm. Silvina Zanela**
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:

Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 BioSystems S.A.

[Signature]
 Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TECNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.



9 4 4 2

Proyecto de Rótulos Internos

-Reactivos de preamplificación de la caja 5

Filter Plate
For Pre-Amplification Use Only

REF 15026758

LOT 123456

89897A illumina

-Reactivos de posamplificación de la caja 5
-Tampón de elución

DX2010987 - EBT
Elution Buffer

REF 15035474

LOT 1234567890

4.8 mL

0001/01/01

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15036608.B

15°C → 30°C

IVD CE

illumina

-Tampón de almacenamiento de biblioteca

DX2002794 - LNS1
Library Storage Buffer

REF 15035470

LOT 1234567890

3.5 mL

0001/01/01

illumina, Inc.
San Diego, CA 92122 USA
Label PN: 15036619.B

15°C → 30°C

IVD CE

illumina

[Handwritten signature]

Lic. Alejandro Díez
Apoderado
BioSystems S.A.

[Handwritten signature]

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN DE VENTA DE
PRODUCTOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO

Expediente nº 1-47-3110-3178/14-4

Se autoriza a la firma BIOSYSTEMS S.A. a importar y comercializar el Producto para diagnóstico de uso in vitro denominado 1) GENETIC SEQUENCING INSTRUMENT – MiSeqDx™/ INSTRUMENTO DE SECUENCIACIÓN QUE MIDE LAS SEÑALES DE FLUORESCENCIA DE NUCLEOTIDOS MARCADOS MEDIANTE EL USO DE CELDAS DE FLUJO Y REACTIVOS ESPECÍFICOS (MiSeqDx™ Universal Kit 1.0); 2) MiSeqDx™ UNIVERSAL KIT 1.0/ PARA EL PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE ADN GENÓMICO HUMANO OBTENIDAS A PARTIR DE SANGRE TOTAL PERIFÉRICA Y EN LA POSTERIOR SECUENCIACIÓN SELECTIVA DE LAS BIBLIOTECAS DE MUESTRAS RESULTANTES; 3) MiSeqDx™ CYSTIC FIBROSIS CLINICAL SEQUENCING ASSAY/ DISEÑADO PARA LA SECUENCIACIÓN DE LAS REGIONES CODIFICANTES Y LAS REGIONES DE UNIÓN DE INTRONES Y EXONES DEL GEN REGULADOR DE LA CONDUCTANCIA TRANSMEMBRANA DE LA FIBROSIS QUISTICA (CFTR) A PARTIR DE ADN GENÓMICO AISLADO A PARTIR DE SANGRE HUMANA TOTAL; 4) MiSeqDx™ CYSTIC FIBROSIS 139- VARIANT ASSAY/ ENSAYO CUALITATIVO DISEÑADO PARA DETECTAR EN FORMA SIMULTANEA 139 MUTACIONES Y VARIANTES DE INTERÉS CLÍNICO EN EL GEN REGULADOR DE LA CONDUCTANCIA TRANSMEMBRANA DE LA FIBROSIS QUISTICA (CFTR) . En envases: -----

- 1) GENETIC SEQUENCING INSTRUMENT – MiSeqDx™: No aplica.
- 2) MiSeqDx™ UNIVERSAL KIT 1.0: 96 determinaciones, conteniendo:

- Caja 1:
Reactivos de preamplificación de la caja 1A:

[Handwritten signature]
[Handwritten mark]
LV

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Tampón de hibridación	1 tubo	4,32ml
Mezcla de extensión-ligadura	1 tubo	4,8ml
Cebadores de índice A(A501)-H(A508)	1 tubo por cebador	192µl
Cebadores de índice 1 (A701)-12 (A712)	1 tubo por cebador	128µl
Polimerasa de PCR	1 tubo	56µl
Mezcla maestra de PCR	1 tubo	2,8ml

Reactivos de posamplificación de la caja 1B:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Diluyente de normalización de bibliotecas	1 tubo	4,6ml
Tampón de dilución De biblioteca	1 tubo	4,5ml
Control interno PhiX	1 tubo	10µl

• Caja 2:

Reactivos de posamplificación de la caja 2:

Componente	Cantidad
Cartucho de reactivo de MiSeqDx	2 cartuchos

• Caja 3:

Reactivos de preamplificación de la caja 3A:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Tampón de lavado restrictivo	1 botella	24ml
Tampón de lavado universal	1 tubo	4,8ml

✓ LV



Ministerio de Salud
 Secretaría de Políticas, Regulación
 e Institutos
 A.N. M. A.T

Reactivos de posamplificación de la caja 3B:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Bolas de limpieza de PCR	1 tubo	5ml
Lavado de normalización de bibliotecas	2 tubos	4,8ml
Bolas de biblioteca	1 tubo	1,2ml
Celda de flujo MiSeqDx	2 contenedores	1 celda de flujo

• Caja 4:

Reactivos de posamplificación de la caja 4:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Solución SBS de MiSeqDx(PR2)	2 botellas	353,1ml

• Caja 5:

Reactivos de preamplificación de la caja 5:

Componente	Cantidad
Placa del filtro	2 placas

Reactivos de posamplificación de la caja 5:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Tampón de elución	1 tubo	4,8ml
Tampón de almacenamiento de biblioteca	1 tubo	3,5ml

3) MiSeqDx™ CYSTIC FIBROSIS CLINICAL SEQUENCING ASSAY: 48 determinaciones, conteniendo:

• Caja 1:

Reactivos de preamplificación de la caja 1A:

Handwritten signature and initials

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Grupo de Oligonucleótidos del Ensayo de Secuenciación clínica De fibrosis quística.	1 tubo	600µl
Tampón de hibridación	1 tubo	4,32ml
Mezcla de extensión-ligadura	1 tubo	4,8ml
Cebadores de índice C(A503), D(A504) y E(A505)	1 tubo por cebador	192µl
Cebadores de índice 1(A701), 2(A702) y 10(A710)	1 tubo por cebador	128µl
Polimerasa de PCR	1 tubo	56µl
Mezcla maestra de PCR	1 tubo	2,8ml

Reactivos de posamplificación de la caja 1B:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Diluyente de normalización de bibliotecas	1 tubo	4,6ml
Tampón de dilución De biblioteca	1 tubo	4,5ml
Control interno PhiX	1 tubo	10µl

• Caja 2:

Reactivos de posamplificación de la caja 2:

Componente	Cantidad
Cartucho de reactivo de MiSeqDx: Ensayo de secuenciación clínica de FQ	6 cartuchos

• Caja 3:

Reactivos de preamplificación de la caja 3A:

Handwritten marks: a stylized signature and the letters 'LW'.



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Tampón de lavado restrictivo	1botella	24ml
Tampón de lavado universal	1tubo	4,8ml

Reactivos de posamplificación de la caja 3B:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Bolas de limpieza de PCR	1tubo	5ml
Lavado de normalización de bibliotecas	2tubos	4,8ml
Bolas de biblioteca	1tubo	1,2ml
Celda de flujo de MiSeqDx: Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística	6contenedores	1 celda de flujo

- Caja 4:

Reactivos de posamplificación de la caja 4:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Solución SBS de MiSeqDx(PR2): Ensayo de Secuenciación clínica de la fibrosis quística	6botellas	353,1ml

- Caja 5:

Reactivos de preamplificación de la caja 5:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Placa del filtro	6placas	N/A

Handwritten marks:
A large checkmark and the letters "LV" are present in the bottom left corner of the page.

Reactivos de posamplificación de la caja 5:

Componente	Cantidad	Volumen de llenado
Tampón de elución	1 tubo	4,8ml
Tampón de almacenamiento de biblioteca	1 tubo	3,5ml

4) MiSeqDx™ CYSTIC FIBROSIS 139- VARIANT ASSAY: 96 determinaciones o 960 determinaciones, conteniendo:

- Caja 1:

Reactivos de preamplificación de la caja 1A:

Componente	Cantidad		Volumen de llenado
	960 determinaciones	96 determinaciones	
Grupo de Oligonucleótidos de 139 variantes de fibrosis quística	10 tubos	1 tubo	600µl
Tampón de hibridación	10 tubos	1 tubo	4,32ml
Mezcla de extensión-ligadura	10 tubos	1 tubo	4,8ml
Cebadores de índice A(A501)-H(A508)	10 tubos por cebador	1 tubo por cebador	192µl
Cebadores de índice 1 (A701)-12 (A712)	10 tubos por cebador	1 tubo por cebador	128µl
Polimerasa de PCR	10 tubos	1 tubo	56µl
Mezcla maestra de PCR	10 tubos	1 tubo	2,8ml

Reactivos de posamplificación de la caja 1B:

Componente	Cantidad		Volumen de llenado
	960 determinaciones	96 determinaciones	

A b w



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

Diluyente de normalización de bibliotecas	10 tubos	1 tubo	4,6ml
Tampón de dilución de biblioteca	10 tubos	1 tubo	4,5ml
Control interno PhiX	1 tubo	1 tubo	10µl

• Caja 2:

Reactivos de posamplificación de la caja 2:

Componente	Cantidad	
	960 determinaciones	96 determinaciones
Cartucho de reactivo De MiSeqDx del ensayo de 139 variantes de FQ	20 cartuchos	2 cartuchos

• Caja 3:

Reactivos de preamplificación de la caja 3A:

Componente	Cantidad		Volumen de llenado
	960 determinaciones	96 determinaciones	
Tampón de lavado restrictivo	10 botellas	1 botella	24ml
Tampón de lavado universal	10 tubos	1 tubo	4,8ml

Reactivos de posamplificación de la caja 3B:

Componente	Cantidad		Volumen de llenado
	960 determinaciones	96 determinaciones	
Bolas de limpieza de PCR	10 tubos	1 tubo	5ml
Lavado de normalización de bibliotecas	20 tubos	2 tubos	4,8ml
Bolas de biblioteca	10 tubos	1 tubo	1,2ml
Celda de flujo de MiSeqDx del ensayo de 139 variantes de FQ	20 contenedores	2 contenedores	1 celda de flujo

Handwritten signature and initials: LV

- Caja 4:

Reactivos de posamplificación de la caja 4:

Componente	Cantidad		Volumen de llenado
	960 determinaciones	96 determinaciones	
Solución SBS de MiSeq Dx (PR2) del ensayo de 139 variantes de FQ	20 botellas	2 botellas	353,1 ml

- Caja 5:

Reactivos de preamplificación de la caja 5:

Componente	Cantidad	
	960 determinaciones	96 determinaciones
Placa del filtro	20 placas	2 placas

Reactivos de posamplificación de la caja 5:

Componente	Cantidad		Volumen de llenado
	960 determinaciones	96 determinaciones	
Tampón de elución	10 tubos	1 tubo	4,8 ml
Tampón de almacenamiento de biblioteca	10 tubos	1 tubo	3,5 ml

Se le asigna la categoría: venta a Laboratorios de análisis clínicos por hallarse en las condiciones establecidas en la Ley N° 16.463 y Resolución Ministerial N° 145/98. Lugar de elaboración: ILLUMINA. 5200 Illumina Way. San Diego, CA 92122. (USA). Vida útil: 1) CINCO (5) años, desde la fecha de elaboración conservado entre -10 y 40 °C; 2), 3) y 4) TRECE (13) meses, desde la fecha de elaboración conservado: caja 1 y 2 entre -25 y -15 °C, caja 3 y 4 entre 2 y 8 °C y caja 5 entre 15 – 30 °C En las etiquetas de los envases, anuncios y prospectos

Handwritten signature/initials



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

deberá constar PRODUCTO PARA DIAGNOSTICO USO IN VITRO AUTORIZADO
POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y
TECNOLOGIA MEDICA. Certificado n° 008334

ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA
MEDICA

Buenos Aires,

11 NOV. 2015

Firma y sello

DR. LEONARDO VERNA
SUBADMINISTRADOR NACIONAL
DECRETO N° 1368/2015
A.N.M.A.T.

d
v