

Instrucciones de uso



LymphoTrack® Dx Software – MiSeq™ Versión 2.4.6

Este paquete de software se suministra con todos los ensayos LymphoTrack Dx para el instrumento Illumina MiSeq de análisis de archivos FASTQ sin formato. El software está compuesto por tres elementos: la aplicación de análisis de datos LymphoTrack, el complemento LymphoTrack Reporter, que se ejecuta automáticamente después del análisis, y el método de visualización opcional LymphoTrack, que consta de cuatro hojas de cálculo XLSM de Microsoft Excel. El software se ejecuta en plataformas compatibles de Microsoft Windows®.

Este paquete de software permite analizar la clonalidad de datos de dianas únicas o múltiples (*IGHV* Leader [o “Leader”], *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* o *TRG*); además, proporciona el estado de hipermutación somática de las muestras procesadas con los ensayos Leader o *IGH* FR1.

IVD Para uso diagnóstico *in vitro*.

Compatibilidad del producto

Este LymphoTrack Dx Software – MiSeq (**REF** 95000009) se ha desarrollado específicamente y es compatible **únicamente** con los siguientes ensayos de Invivoscribe:

N.º de catálogo	Descripción	UDI
REF 91210059	LymphoTrack Dx <i>IGHV</i> Leader Somatic Hypermutation Assay Kit A – MiSeq	00850052003814
REF 91210069	LymphoTrack Dx <i>IGHV</i> Leader Somatic Hypermutation Assay Panel – MiSeq	00850052003821
REF 91210009	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR1 Assay Kit A – MiSeq	00850052003647
REF 91210039	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR1 Assay Panel – MiSeq	00850052003654
REF 91210089	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR2 Assay Kit A – MiSeq	00850052003838
REF 91210099	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR2 Assay Panel – MiSeq	00850052003845
REF 91210109	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR3 Assay Kit A – MiSeq	00850052003852
REF 91210119	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR3 Assay Panel – MiSeq	00850052003869
REF 91210129	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR1/2/3 Assay Kit A – MiSeq	00850052003876
REF 91210139	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR1/2/3 Assay Panel – MiSeq	00850052003883
REF 91220009	LymphoTrack Dx <i>IGK</i> Assay Kit A – MiSeq	00850052003906
REF 91220019	LymphoTrack Dx <i>IGK</i> Assay Panel – MiSeq	00850052003913
REF 92270019	LymphoTrack Dx <i>TRG</i> Kit A – MiSeq	00850052003678
REF 92270009	LymphoTrack Dx <i>TRG</i> Panel – MiSeq	00850052003661
REF 92250009	LymphoTrack Dx <i>TRB</i> Kit A – MiSeq	00850052003937
REF 92250019	LymphoTrack Dx <i>TRB</i> Panel – MiSeq	00850052003944

Índice

1.	USO PREVISTO.....	3
2.	GLOSARIO Y ABREVIATURAS.....	3
3.	REQUISITOS MÍNIMOS DEL SISTEMA.....	4
4.	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.....	4
5.	INSTALACIÓN DEL SOFTWARE.....	4
6.	EJECUCIÓN DEL SOFTWARE DE ANÁLISIS DE DATOS.....	5
7.	VISUALIZACIÓN DE DATOS MEDIANTE LYMPHOTRACK REPORTER (AUTOMÁTICO, RECOMENDADO).....	9
8.	VISUALIZACIÓN DE DATOS (MANUAL): EJECUCIÓN DE LAS HOJAS DE CÁLCULO DE VISUALIZACIÓN DE DATOS DE EXCEL (DESACONSEJADO).....	10
9.	SERVICIO TÉCNICO Y ATENCIÓN AL CLIENTE.....	13
10.	SÍMBOLOS.....	13
11.	AVISO LEGAL.....	13
12.	PREGUNTAS FRECUENTES SOBRE EL SOFTWARE.....	14

1. Uso previsto

El paquete LymphoTrack Dx Software – MiSeq se ha diseñado para el análisis de datos bioinformáticos y la visualización de archivos FASTQ sin formato procedentes del instrumento Illumina MiSeq cuando este se usa con ensayos LymphoTrack Dx.

2. Glosario y Abreviaturas

2.1. Glosario

Tabla 1. Términos del glosario

Término	Definición
Clonales	Conjunto de células u organismos genéticamente idénticos producidos a partir de una única célula progenitora.
Inválido	Un resultado de muestra o control que no cumple con los criterios de validez.
Versionado semántico	Un esquema de versión de software que consta de 3 números (Mayor.Minor.Patch), alineado con el factor de riesgo de la actualización.
Software	LymphoTrack Dx Software - MiSeq
Sistema	El paquete completo de software, hardware y ensayo (según corresponda) que componen el dispositivo médico.

2.2. Abreviaturas

Tabla 2. Abreviaturas definidas

Abreviaturas	Definición
CDR3	Región determinante de la complementariedad, formada por la unión de segmentos V-(D)-J y establece la diversidad de la respuesta inmune celular.
CSV	Formato de archivo de valores separados por comas
FASTQ	Un formato basado en texto para almacenar tanto una secuencia biológica (generalmente una secuencia de nucleótidos) como sus correspondientes puntuaciones de calidad.
FFPE	Embebido en parafina fijado en formalina.
IFU	Instrucciones de uso
IGH FR1	Cadena pesada de inmunoglobulina Marco 1
IGH FR2	Cadena pesada de inmunoglobulina Marco 2
IGH FR3	Cadena pesada de inmunoglobulina Marco 3
IGHV	Los genes de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina
IGK	Cadena ligera kappa de inmunoglobulina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDF	Formato de Documento Portable
SHM	Hipermutación somática
TRB	Receptor beta de células T
TRG	Receptor gamma de células T
TSV	Formato de archivo de valores separados por tabulaciones
USB	Bus serie universal; Permite el intercambio de datos y la entrega de energía entre muchos tipos diferentes de componentes electrónicos.

3. Requisitos mínimos del sistema

- **Procesador:** se recomienda una CPU con Intel Core 2 Duo o superior.
- **Disco duro:** se requieren al menos 80 GB de espacio libre en disco; se recomiendan 250 GB.
- **RAM:** se necesitan 4 GB; se recomiendan 8 GB o más.
- **Sistema operativo:** es necesario disponer de Windows 10 Pro o Windows 11 Pro (64 bits).
- Lector de archivos PDF, como Adobe Acrobat Reader, para visualizar los informes de datos generados por LymphoTrack Reporter.
- Microsoft Office Excel 2007, 2010 o 2013 con la función de macros habilitada para la visualización de datos.
- Unidad de CD-ROM.
- LymphoTrack Dx Software – MiSeq v2.4.6.IVD está validado para su uso con Windows 10 Pro y Windows 11 Pro en inglés (Estados Unidos) con el tamaño de pantalla predeterminado y con Microsoft Excel 2007/2010/2013 para la visualización de otros datos. El uso de otras versiones de Windows/Excel o de configuraciones de idioma/tamaño de pantalla diferentes podría no ser compatible.

4. Advertencias y precauciones

- **Tamaño de pantalla predeterminado.** La resolución de pantalla óptima para LymphoTrack Dx Software – MiSeq es del 100 %. Una configuración de tamaño de pantalla superior al 100 % puede afectar a la presentación del texto en la interfaz de usuario.
- **Fuente del sistema.** La interfaz de usuario se ha diseñado para usar los ajustes predeterminados de fuente del sistema en un equipo con Windows en inglés (EE. UU.). La modificación de los ajustes de fuente del sistema o el uso de una configuración regional de idioma distinta del inglés (EE. UU.) pueden afectar a la presentación del texto en la interfaz de usuario.
- **Archivos compatibles.** LymphoTrack Dx Software – MiSeq es compatible con los archivos FASTQ.GZ generados por el software MiSeq Reporter. LymphoTrack Dx Software – MiSeq no es compatible con los archivos FASTQ.GZ generados por el software *Bcl2fastq*.
- **Ajuste del adaptador.** Al crear hojas de muestras de MiSeq, es necesario seleccionar esta opción para que los archivos FASTQ.GZ generados se ajusten al adaptador.
- **Configuración de suspensión o hibernación.** Considere deshabilitar las funciones de suspensión e hibernación antes de ejecutar la aplicación de análisis de datos de LymphoTrack Dx. Si se activa el modo de suspensión o hibernación, el software podría dejar de funcionar.
- **Caracteres en nombres de rutas de acceso y archivos.** 1) Evite usar espacios en los nombres de las rutas de acceso a los archivos de datos o al software (las rutas de acceso incluyen nombres de carpetas y archivos); no se permite más de un espacio consecutivo. 2) Es importante que los nombres de los archivos solo contengan caracteres alfanuméricos y guiones: A-Z, a-z, 0-9 y - (guion). El software puede fallar si detecta caracteres distintos a estos. Asegúrese de usar esta nomenclatura para las muestras al configurar las hojas de muestras de MiSeq. 3) Los nombres de las rutas de acceso no deben tener más de 255 caracteres. Las muestras que generan nombres de archivo cercanos a este límite son complicadas de copiar en otras ubicaciones.
- **Las muestras duplicadas deben tener un nombre exclusivo.** Al etiquetar muestras, utilice nombres e identificadores únicos. Si se procesan muestras por duplicado, pueden nombrarse “Muestra1a” y “Muestra1b”. Si no utiliza nombres exclusivos para las muestras analizadas a la vez en una misma celda de flujo, el software solo analizará una de las muestras en el proceso de análisis.

5. Instalación del software

- 5.1. Haga doble clic en el archivo **LymphoTrackDxMiSeq-2.4.6.IVD.msi** ubicado en el CD del software y siga las instrucciones en pantalla.
 - Instale el software solo en una unidad local y no en una unidad de red.
 - Es posible que la ejecución del software a través de una conexión de red no funcione correctamente.

6. Ejecución del software de análisis de datos

- 6.1. Identifique los archivos FASTQ.GZ pair end con ajuste de adaptador que desee analizar. Estos archivos se encuentran en la carpeta de la serie de MiSeq y son los archivos FASTQ.GZ que se usan como entrada para la aplicación de análisis de datos **LymphoTrackDxMiSeq**.
 - Los archivos *Undetermined_*.fastq.gz* no son necesarios para el análisis.
- 6.2. Copie los archivos FASTQ.GZ indicados arriba en una carpeta vacía del equipo. Descargue estos archivos en el mismo equipo local en el que ha instalado el software LymphoTrack Dx.
 - La unidad en la que se encuentre esta carpeta debe tener al menos 80 GB de espacio libre.
 - Esta será la **<input_folder>** (**<carpeta_de_entrada>**) a la que se hace referencia en el software a continuación.
- 6.3. Haga doble clic en el archivo de aplicación ***LymphoTrackDxMiSeq-2.4.6.IVD*** de la carpeta ubicado **Invivoscribe** creada durante la instalación.
 - La ubicación predeterminada es *Disco local (C:) > Invivoscribe*.
- 6.4. Lea el acuerdo de licencia. Haga clic en el botón **Accept (Aceptar)** para aceptar los términos de la licencia y continuar.
- 6.5. Seleccione el modo de análisis deseado mediante las casillas de verificación *Choose analysis mode(s) (Seleccionar modos de análisis)*.
 - El modo de análisis debe corresponder al tipo de datos del análisis (Leader, IGH FR1, IGH FR2, IGH FR3, IGK, TRB o TRG).
- 6.6. Seleccione el separador decimal que desee utilizar en *Choose decimal mark (Seleccionar marca decimal)*.
 - Se trata de un campo obligatorio que afectará a las macros de visualización de datos de Microsoft Excel más adelante.
 - Las opciones de separación decimal son el punto (".") y la coma (",").

¡IMPORTANTE! **Separador decimal.** Para determinar qué opción debe elegir, abra una hoja de cálculo de Excel nueva y escriba =10000 en la celda A1. Haga clic con el botón derecho en esta celda y seleccione **Format Cells (Formatear celdas)**.

- Busque en la lista *Category (Categoría)* de la pestaña *Number (Número)* el campo **Number (Número)**. A la derecha, ajuste el valor *Decimal Places (Separadores decimales)* en **2**.
- Debajo se encuentra la casilla de verificación *Use 1000 Separator (Usar separador de miles)*. Marque esta casilla y eche un vistazo al número que introdujo a modo de ejemplo. Podrá ver el número introducido originalmente, pero formateado según los valores predeterminados de Excel para números con separador decimal.
- Si el número aparece como "10,000.00", seleccione la opción **decimal point (punto decimal)**. Si el número aparece como "10.000,00", seleccione la opción **decimal comma (coma decimal)**.

- 6.7. Haga clic en el botón **Browse (Examinar)** para elegir una carpeta de entrada. Esta es la **<input_folder>** ya mencionada y contiene los archivos que se desean analizar. Al seleccionar la carpeta de entrada, esta aparecerá vacía.

¡IMPORTANTE! La **<input_folder>** seleccionada no debe contener ningún archivo de muestra con el mismo nombre que la carpeta de entrada. Si el programa se ejecuta con una muestra que comparta el mismo nombre de archivo que la carpeta que se proporcionó como entrada para la funcionalidad de análisis, el programa se congelará y el tiempo de ejecución del análisis aumentará significativamente (es decir, tomará 30 minutos procesar una pequeña muestra que normalmente tarda unos segundos en procesarse).

- 6.8. Una vez seleccionada la **<input_folder>** y el modo de análisis, haga clic en el botón **Launch Program (Iniciar programa)**.
- 6.9. **Estado del análisis.** Tras hacer clic en el botón **Launch Program (Iniciar programa)**, la ventana principal mostrará el estado del programa. Cuando el programa haya terminado de analizar los archivos de datos de entrada, la ventana principal mostrará el mensaje *Analysis is complete... (Análisis finalizado...)* junto a la ubicación de la carpeta de salida. Además, le pedirá que abra la hoja de cálculo Data Visualization (Visualización de datos) de Excel adecuada.
 - Puede iniciar un nuevo análisis desde la ventana principal del programa tan pronto como concluya el análisis anterior.

¡IMPORTANTE! **Duración del análisis.** El número y tamaño de las muestras analizadas, el modo de análisis y el hardware del equipo determinan el tiempo necesario para ejecutar el programa. Una distribución de lectura típica para una serie de 24 muestras es de 200 000 a 1 millón de lecturas por muestra. Estos números pueden cambiar en las futuras versiones de la plataforma MiSeq.

El análisis normal de una sola muestra de *IGHV* Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* o *TRG* requiere 1-2 minutos. Para completar el análisis de una serie de 24 muestras sin combinar de Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* o *TRG* son necesarios 25-50 minutos aproximadamente. Para completar el análisis de una serie de 24 muestras combinadas de Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* o *TRG* se debe multiplicar el tiempo de análisis por el número de dianas analizadas.

6.10. Carpetas de salida. En función del modo de análisis seleccionado, se crearán una o más carpetas de salida en la <input_folder> que contiene los archivos originales FASTQ o FASTQ.GZ.

- La Tabla 3 recoge la relación existente entre el modo de análisis y el nombre de las carpetas de salida.

Tabla 3. Nombre de la carpeta de salida de acuerdo con el modo de análisis

Modo de análisis	Nombre de la carpeta de salida
Leader	LEADER_output (LEADER_salida)
<i>IGH</i> FR1	<i>IGH</i> _FR1_output (<i>IGH</i> _FR1_salida)
<i>IGH</i> FR2	<i>IGH</i> _FR2_output (<i>IGH</i> _FR2_salida)
<i>IGH</i> FR3	<i>IGH</i> _FR3_output (<i>IGH</i> _FR3_salida)
<i>TRB</i>	<i>TRB</i> _output (<i>TRB</i> _salida)
<i>TRG</i>	<i>TRG</i> _output (<i>TRG</i> _salida)
<i>IGK</i>	<i>IGK</i> _output (<i>IGK</i> _salida)
Cualquier combinación de: Leader, <i>IGH</i> FR1, <i>IGH</i> FR2, <i>IGH</i> FR3, <i>IGK</i> , <i>TRB</i> y <i>TRG</i>	De dos a siete carpetas de salida con los nombres indicados arriba

6.11. Si el programa termina su ejecución correctamente, la carpeta de salida contendrá varios archivos TSV y un archivo PDF por cada muestra procesada.

- En las tablas que figuran a continuación, el signo “*” representa el nombre de la muestra, según se ha introducido en la hoja de muestras, seguido de información específica de la plataforma (p.ej., *samplename_S1_L001_001_combined*).
- En cuanto a los análisis de Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *TRB* e *IGK*, consulte la Tabla 4 para obtener más información sobre los nueve archivos que se generan para cada muestra.

Tabla 4. Descripción de los archivos de salida de *IGH*, *TRB* e *IGK*

Análisis de Leader, <i>IGH</i> FR1, <i>IGH</i> FR2, <i>IGH</i> FR3, <i>TRB</i> e <i>IGK</i>	
<i>*.fastq_read_summary_merged_top10_search_top500.tsv</i> (<i>resumen_lectura_combinada_*.fastq_10principales_buscar_500principales.tsv</i>)	Presenta el mismo formato que el archivo <i>read_summary</i> (<i>resumen_lectura</i>) pero recoge únicamente las 10 lecturas más comunes del archivo <i>read_summary</i> (<i>resumen_lecturas</i>) combinadas con las 500 lecturas más comunes. Se combinan entre sí solo aquellas lecturas que se diferencian por 1 o 2 nucleótidos (nt); la lectura más frecuente mantiene la identidad de la secuencia, mientras que la lectura menos frecuente se añade a la anterior.
<i>*.fastq_unique_reads.tsv</i> (<i>.lecturas_individuales_*.fastq.tsv</i>)	Archivo FASTQ con secuencias únicas ordenadas por recuento.
<i>*.fastq_CDR3_unique_reads.tsv</i> (<i>.lecturas_individuales_*.fastq_CDR3.tsv</i>)	Archivo FASTQ con las secuencias putativas de CDR3 del archivo FASTQ_UNIQUE_READS (LECTURASINDIVIDUALES_FASTQ).
<i>*.fastq_VJ_sequence_frequency_family.tsv</i> (<i>frecuencia_secuencia_familia_*.fastq_VJ.tsv</i>)	Cada familia es una agrupación de posibles recombinaciones situadas en una región V o J concreta, como la familia V ₁ o la familia J ₄ . Dentro de la familia V ₁ se puede encontrar cualquier número de recombinaciones, como V ₁₋₆₉ y V ₁₋₈ . Este archivo incluye una lista de todas las posibles recombinaciones de la familia V-J, cada una de ellas con una lista de lecturas ordenada (del % más alto al más bajo). Este archivo tiene un mejor uso en un gráfico <i>apilado</i> de Excel.

Tabla 4. Descripción de los archivos de salida de *IGH*, *TRB* e *IGK*

Análisis de Leader, <i>IGH</i> FR1, <i>IGH</i> FR2, <i>IGH</i> FR3, <i>TRB</i> e <i>IGK</i>	
<p style="text-align: center;"><i>*.fastq_read_summary.tsv</i> (<i>resumen_de_lecturas_de_*.fastq.tsv</i>)</p>	<p>Contiene una lista con las 200 secuencias únicas más comunes ordenadas por recuento (número de lecturas) e indica:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ En qué recombinación V-J encaja mejor cada una ▪ Tamaño ▪ % real de lecturas totales ▪ % acumulado de lecturas totales ▪ Hasta qué punto la lectura abarca el gen V identificado como diana por los cebadores (%) (<i>IGH/IGK</i> y <i>TRB</i>) ▪ Secuencia putativa de CDR3 <p>Leader e <i>IGH</i> FR1 también contienen:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tasa de mutación para el gen V parcial (%) <p>Leader, <i>IGH</i> FR1, <i>IGH</i> FR2 e <i>IGH</i> FR3 también contienen:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ La predicción de que el reordenamiento se ajuste in-frame (Y/N/n/a) (S/N/N.P.). Si no puede indicarse el uso del segmento genético V o J debido a la mala calidad de la alineación, el software no podrá predecir si el gen se ajusta in-frame, por lo que el resultado será <i>n/a</i> (N. P.). ▪ La predicción de que el reordenamiento no contenga el codón de parada (Y/N) (S/N). Si no se puede realizar la predicción de ajuste in-frame, no se podrá indicar con precisión la presencia del codón de parada.
<p style="text-align: center;"><i>*.fastq_read_summary_family.tsv</i> (<i>frecuencia_secuencia_familia_*.fastq.tsv</i>)</p>	<p>Contiene una lista de secuencias únicas ordenadas en función del número de lecturas e indica:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ En qué recombinación de la familia V-J encaja mejor cada una ▪ Tamaño ▪ % real de lecturas totales ▪ % acumulado de lecturas totales ▪ Hasta qué punto la lectura abarca el gen V identificado como diana por los cebadores (%) (<i>IGH/IGK</i>) ▪ Secuencia putativa de CDR3 <p>Leader e <i>IGH</i> FR1 también contienen:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tasa de mutación para el gen V parcial (%) <p>Leader, <i>IGH</i> FR1, <i>IGH</i> FR2 e <i>IGH</i> FR3 también contienen:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ La predicción de que el reordenamiento se ajuste in-frame (Y/N/n/a) (S/N/N. P.). ▪ La predicción de que el reordenamiento no contenga el codón de parada (Y/N) (S/N)
<p style="text-align: center;"><i>*.fastq_VJ_usage.tsv</i> (<i>uso_*.fastq_VJ.tsv</i>)</p>	<p>Matriz de recuento y matriz de % de distintas recombinaciones V-J.</p>
<p style="text-align: center;"><i>*.fastq_VJ_usage_family.tsv</i> (<i>uso_familia_*.fastq_VJ.tsv</i>)</p>	<p>Matriz de recuento y matriz de % de distintas recombinaciones de familias V-J.</p>
<p style="text-align: center;"><i>*<timestamp>.pdf</i> (<i>*<hora>.pdf</i>)</p>	<p>Informe en formato PDF generado por LymphoTrack Reporter con datos similares a los del archivo <i>merged read summary</i> (<i>resumen de lecturas combinadas</i>), el archivo <i>read summary</i> (<i>resumen de lecturas</i>), el gráfico <i>V-J usage</i> (<i>Uso de V-J</i>) y el gráfico <i>V-J sequence frequency</i> (<i>Frecuencia de la secuencia V-J</i>). Consulte el apartado Z: <u>Visualización de datos mediante LymphoTrack Reporter (automático, recomendado)</u> para obtener más información.</p>

Nota: El análisis de *IGK* incluye información sobre otros elementos del locus de *IGK* implicados en las recombinaciones (*IGKINTR* e *IGKDEL*).

Nota: El análisis de *TRB* incluye información sobre otros elementos del locus de *TRB* implicados en las recombinaciones de la región D-J.

Nota: La *Putative CDR3 sequence* (*Secuencia putativa de CDR3*) se determina haciendo coincidir una definición exacta de una secuencia de CDR3. Cualquier mutación de los puntos de anclaje o alteración del marco de lectura dará lugar a un valor *not found* (*no encontrado*).

- En cuanto al análisis de TRG, consulte la Tabla 7. Hojas de cálculo del archivo de salida de Excel para obtener más información sobre los siete archivos que se generan para cada muestra.

Tabla 5. Descripción de los archivos de salida de TRG

Análisis de TRG	
<p><i>*.fastq_read_summary.tsv</i> (<i>resumen_de_lecturas_de_*.fastq.tsv</i>)</p>	<p>Contiene una lista de secuencias únicas ordenadas en función del número de lecturas e indica:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ En qué recombinación V-J encaja mejor cada una ▪ Tamaño ▪ % real de lecturas totales ▪ % acumulado de lecturas totales ▪ Secuencia putativa de CDR3
<p><i>*.fastq_read_summary_merged_top10_search_top500.tsv</i> (<i>resumen_lectura_combinada_*.fastq_10principales_buscar_500principales.tsv</i>)</p>	<p>Presenta el mismo formato que el archivo <i>read_summary</i> (<i>resumen_lectura</i>) pero recoge únicamente las 10 lecturas más comunes del archivo <i>read_summary</i> (<i>resumen_lecturas</i>) combinadas con las 500 lecturas más comunes. Dos lecturas se combinan entre sí solo si se diferencian en 1 o 2 nucleótidos; la lectura más frecuente mantiene su identidad de secuencia, mientras que la lectura menos frecuente se añade a la más frecuente.</p>
<p><i>*.fastq_unique_reads.tsv</i> (<i>.lecturas_individuales_*.fastq.tsv</i>)</p>	<p>Archivo FASTQ con secuencias únicas ordenadas por recuento.</p>
<p><i>*.fastq_CDR3_unique_reads.tsv</i> (<i>.lecturas_individuales_*.fastq_CDR3.tsv</i>)</p>	<p>Archivo FASTQ con las secuencias putativas de CDR3 del archivo FASTQ_UNIQUE_READS (LECTURAS_INDIVIDUALES_FASTQ).</p>
<p><i>*.fastq_VJ_sequence_frequency.tsv</i> (<i>frecuencia_secuencias_*.fastq_VJ.tsv</i>)</p>	<p>Una lista de todas las posibles recombinaciones V-J, cada una de ellas con una lista de lecturas ordenada (del % más alto al más bajo). El primer número representa el % del total de lecturas en las que se tiene en cuenta la primera lectura única de todas las lecturas secuenciadas. Este archivo tiene un mejor uso en un gráfico “apilado” de Excel.</p>
<p><i>*.fastq_VJ_usage.tsv</i> (<i>uso_*.fastq_VJ.tsv</i>)</p>	<p>Matriz de recuento y matriz de % de distintas recombinaciones V-J.</p>
<p><i>*<timestamp>.pdf</i> (<i>*<hora>.pdf</i>)</p>	<p>Informe en formato PDF generado por LymphoTrack Reporter con datos similares a los del archivo <i>merged read summary</i> (<i>resumen de lecturas combinadas</i>), el archivo <i>read summary</i> (<i>resumen de lecturas</i>), el gráfico <i>VJ usage</i> (<i>Uso de V-J</i>) y el gráfico <i>VJ sequence frequency</i> (<i>Frecuencia de la secuencia V-J</i>). Consulte el apartado 3: <u><i>Visualización de datos mediante LymphoTrack Reporter (automático, recomendado)</i></u> para obtener más información.</p>

Nota: La *Putative CDR3 sequence* (*Secuencia putativa de CDR3*) se determina haciendo coincidir una definición exacta de una secuencia de CDR3. Cualquier mutación de los puntos de anclaje o alteración del marco de lectura dará lugar a un valor *not found* (*no encontrado*).

- Las carpetas de salida contienen los informes en formato PDF y los archivos de datos de salida en formato TSV.
- Los archivos en formato TSV se pueden usar como entradas de las hojas de cálculo de *visualización de datos*.

7. Visualización de datos mediante LymphoTrack Reporter (automático, recomendado)

7.1. Al finalizar el análisis, se genera de forma automática un informe en PDF para cada muestra. El nombre del informe coincide con el nombre de la muestra en la hoja de muestras y contiene, además, datos específicos de la plataforma y una marca de tiempo (DDMMAAhhmss).

¡IMPORTANTE! **Preste atención al guardar el informe en formato PDF:** en función del programa que utilice para abrir archivos PDF, podrá editar una o más columnas. NO realice cambios en ninguna parte del archivo PDF. Si sospecha que el archivo PDF se ha modificado, NO lo guarde. Si cree que se ha podido guardar algún cambio, vuelva a ejecutar el análisis y genere un nuevo informe en formato PDF.

7.2. La primera página del informe en formato PDF incluye un valor **Index Q30 (Índice Q30)**, calculado como el porcentaje de las bases que tienen una puntuación de calidad de 30 o superior, pero solo a partir de las lecturas asignadas a un índice después del ajuste. Este valor se puede usar para determinar si el índice cumple las especificaciones estándar de Illumina.

- En algunos casos, la puntuación Q30 proporcionada por el secuenciador para una serie subestimar la calidad de la serie debido al recuento de secuencias sin determinar y a las regiones sin ajustar a Q30.
- Las regiones sin determinar y sin ajustar suelen ser de menor calidad y no contribuyen al análisis posterior de LymphoTrack.

7.3. La primera página del informe en formato PDF recoge la tabla de resultados del **merged read summary (resumen de lecturas combinadas)**, así como los gráficos de resultados de **V-J Sequence Frequency (Frecuencia de la secuencia V-J)** y **V-J Usage (Uso de V-J)**. Las páginas restantes contienen una tabla con los resultados del **read summary (resumen de lecturas)** sin combinar.

- La Tabla 6 detalla el contenido de dichas páginas:

Tabla 6. Descripción del contenido del informe en formato PDF

Archivo PDF generado por LymphoTrack Reporter	
<p><i>Read Summary</i> (Resumen de lecturas)</p>	<p>Contiene una lista con las 200 secuencias únicas más comunes ordenadas por recuento e indica:</p> <ul style="list-style-type: none"> • En qué recombinación V-J encaja mejor cada secuencia <ul style="list-style-type: none"> ○ Secuencia ○ Tamaño de la secuencia ○ % real de lecturas totales • % acumulado de lecturas totales en las 200 lecturas más comunes <ul style="list-style-type: none"> ○ Hasta qué punto la lectura abarca el gen V identificado como diana por los cebadores (%) (IGH/IGK) ○ Secuencia putativa de CDR3 <p>Leader e IGH FR1 también contienen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tasa de mutación para el gen V parcial (%) <p>Leader, IGH FR1, IGH FR2 e IGH FR3 también contienen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • La predicción de que el reordenamiento se ajuste in-frame (Y/N/n/a) (S/N/N.P.). Si no puede indicarse el uso del segmento genético V o J debido a la mala calidad de la alineación, el software no podrá predecir si el gen se ajusta in-frame, por lo que el resultado será n/a (N.P.). • La predicción de que el reordenamiento no contenga el codón de parada (Y/N) (S/N). Si no se puede realizar la predicción de ajuste in-frame, no se podrá indicar con precisión la presencia del codón de parada.
<p><i>Merged Read Summary</i> (Resumen de lecturas combinadas)</p>	<p>Presenta el mismo formato que la hoja de cálculo <i>Read Summary (Resumen de lecturas)</i>, pero solo abarca las 10 lecturas más comunes tras la combinación con las 500 más comunes solo si las lecturas se diferencian en 1 o 2 nucleótidos. Además, la puntuación Q30 del índice se muestra debajo de <i>Total Read Count (Recuento total de lecturas)</i>.</p>

Tabla 6. Descripción del contenido del informe en formato PDF

Archivo PDF generado por LymphoTrack Reporter	
V-J Sequence Frequency Graph (Gráfico de frecuencia de las secuencias V-J)	Se trata de un histograma que recoge las 200 frecuencias de secuencia más comunes de cada recombinación de familias V-J (para <i>IGH/IGK</i> y <i>TRB</i>) o de genes V-J (para <i>TRG</i>).
V-J Usage Graph (Gráfico de uso de V-J)	Se trata de un gráfico de barras tridimensional que recoge el uso de familias V-J en las 200 secuencias más comunes (para <i>IGH/IGK</i> y <i>TRB</i>) o de genes V-J en todas las secuencias (para <i>TRG</i>).

Nota: La *Putative CDR3 sequence* (*Secuencia putativa de CDR3*) se determina haciendo coincidir una definición exacta de una secuencia de CDR3. Cualquier mutación de los puntos de anclaje o alteración del marco de lectura dará lugar a un valor “not found” (no encontrado).

Nota: El análisis de *IGK* incluye información sobre otros elementos del locus de *IGK* implicados en las recombinaciones (*IGKINTR* e *IGKDEL*).

Nota: El análisis de *TRB* incluye información sobre otros elementos del locus de *TRB* implicados en las recombinaciones de la región D-J.

8. Visualización de datos (manual): ejecución de las hojas de cálculo de visualización de datos de Excel (desaconsejado)

8.1. Revise la configuración de seguridad de Microsoft Excel para asegurarse de que esté habilitado el uso de macros:

- 8.1.1. Excel 2007: haga clic en el botón de **Office** y seleccione **Excel Options (Opciones de Excel)**.
- 8.1.2. Excel 2010/2013: haga clic en **File (Archivo)** y, a continuación, en **Options (Opciones)**.
- 8.1.3. En la ventana *Options (Opciones)*, haga clic en **Trust Center (Centro de confianza)** y, a continuación, en **Trust Center Settings... (Configuración del Centro de confianza)**.
- 8.1.4. Haga clic en **Macro Settings (Configuración de macros)** y configure la opción *Disable all macros with notification (Deshabilitar todas las macros con notificación)*.
- 8.1.5. Haga clic en **Ok (Aceptar)**. A continuación, vuelva a hacer clic en **Ok (Aceptar)**.
- 8.1.6. Salga de Excel.

¡IMPORTANTE! Debido a que los archivos de visualización se pueden guardar como un libro de trabajo (lo que eliminaría la capacidad de funcionamiento de la macro), copie los archivos de visualización en una ruta de archivo diferente antes de comenzar los análisis.

8.2. Haga doble clic en el archivo de hoja de cálculo de visualización de datos correspondiente para abrirlo. Los archivos de visualización se encuentran en la subcarpeta “visualizaciones” ubicada en la carpeta de instalación del software. Los siguientes archivos de hojas de cálculo de visualización están disponibles:

- LymphoTrackDxIGHVisualization.xlsm* para *Leader*, *IGH FR1*, *IGH FR2* e *IGH FR3*
- LymphoTrackDxIGKVisualization.xlsm* para *IGK*
- LymphoTrackDxTRBVisualization.xlsm* para *TRB*
- LymphoTrackDxTRGVisualization.xlsm* para *TRG*

8.3. Es posible que aparezca el siguiente mensaje al abrir el archivo: Security Warning - Macros have been disabled (Advertencia de seguridad: Las macros se han deshabilitado).

- 8.3.1. Excel 2007: haga clic en el botón **Options... (Opciones...)**, situado a la derecha de la advertencia, y seleccione **Enable this content (Habilitar este contenido)**. A continuación, haga clic en **Ok (Aceptar)**.
- 8.3.2. Excel 2010/2013: haga clic en el botón **Enable Content (Habilitar contenido)**.
 - La macro de visualización de los datos se iniciará de forma automática.

8.4. Se mostrará el Acuerdo de licencia; Esto debe ser aceptado para utilizar el software.

- Después de aceptar el contrato de licencia, se abrirá un cuadro de diálogo con el mensaje: *Please select the Read Summary file for the sample you want (Seleccione el archivo de resumen de lecturas de la muestra que desee)*.
- La macro solo permite visualizar los datos de una muestra cada vez, por lo que este procedimiento deberá repetirse para cada muestra que se desee visualizar.

8.5. Busque la carpeta de salida creada por la aplicación de análisis de datos que contiene los datos para visualizar. Seleccione el archivo **FASTQ_READ_SUMMARY (RESUMEN_DE_LLECTURAS_DE_FASTQ)** de la muestra que desea examinar.

8.6. Haga clic en el botón **Open (Abrir)**.

- La macro cargará los archivos de datos de la muestra seleccionada y creará varias hojas de cálculo con distintas vistas de los datos.
- El sistema tardará más o menos en cargar los archivos en función del tamaño de la muestra y del hardware del equipo.

¡IMPORTANTE! El software de visualización no puede mostrar más de 1 048 576 filas de datos por hoja debido a las limitaciones de Microsoft Excel. Si alguno de los archivos de salida del análisis de datos de la muestra actual contiene más filas, solo se mostrarán las 1 048 576 primeras.

Si se alcanza dicho límite, aparecerá un mensaje para indicar qué hojas están afectadas por esta limitación. Haga clic en **OK (Aceptar)** para continuar.

Aunque no se puedan mostrar todos los datos, los gráficos no se verán afectados y seguirán siendo precisos.

¡IMPORTANTE! Los gráficos se generan dando por hecho que la dirección de visualización se ha configurado en **Left-to-right (Izquierda a derecha)**. En los países en los que la dirección normal de lectura es de derecha a izquierda, la configuración predeterminada de Excel puede no ser compatible y es posible que los gráficos no se generen correctamente. Para solucionar esto, cambie la opción de visualización de Excel a **Left-to-right (Izquierda a derecha)**. Para ello, seleccione *Office > Excel Options (Opciones de Excel)* en Excel 2007 o *File > Options (Archivo > Opciones)* en Excel 2010/2013. Seleccione **Advanced (Opciones avanzadas)** y desplácese hasta el apartado *Display (Mostrar)*. Cambie la opción *Default direction (Dirección predeterminada)* a **Left-to-right (Izquierda a derecha)** y haga clic en **OK (Aceptar)**. La próxima vez que abra Excel, las hojas de cálculo se leerán de izquierda a derecha y el software de visualización generará los gráficos correctamente.

Si tiene este problema y necesita más ayuda, póngase en contacto con el servicio técnico de Invivoscribe llamando al +1 (858) 224-6600, de lunes a viernes de 07:00 a 17:00 PST/PDT, o enviando un correo electrónico a support@invivoscribe.com.

8.6.1. Si aparece algún mensaje sobre *Complex Formatting (Formato complejo)*, haga clic en **Yes (Sí)**.

8.7. Guardar el archivo de visualización. Cuando termine de procesarse el archivo, aparecerá un mensaje que le indicará que se ha completado el procesamiento. Es muy recomendable guardar el archivo en este punto.

¡IMPORTANTE! Al guardar el archivo, asegúrese de seleccionar **Save As (Guardar como)** y elegir Excel Workbook (Libro de Excel) (XLSX o XLS), ya que si selecciona **Save (Guardar)** o hace clic en el botón del disco, reemplazará la macro XLSM por este libro de Excel. En tal caso, tendrá que volver a instalar la macro desde el CD del software para realizar análisis posteriormente.

8.7.1. Si aparece algún mensaje de advertencia acerca de guardar como libro sin macros, haga clic en **Yes (Sí)**.

8.8. El libro de Excel completo para Leader, *IGH FR1, IGH FR2, IGH FR3, IGK, TRB* y *TRG* incluirá las ocho hojas de cálculo que se describen en la Tabla 7.

Tabla 7. Hojas de cálculo del archivo de salida de Excel

Libro de Excel completo para Leader, <i>IGH FR1, IGH FR2, IGH FR3, IGK, TRB</i> y <i>TRG</i>	
<i>Merged Read Summary</i> (Resumen de lecturas combinadas)	Presenta el mismo formato que la hoja de cálculo <i>Read Summary (Resumen de lecturas)</i> , pero solo abarca las 10 lecturas más comunes tras la combinación con las 500 más comunes solo si las lecturas se diferencian en 1 o 2 nucleótidos.
<i>VJ Sequence Frequency Graph</i> (Gráfico de frecuencia de las secuencias V-J)	Se trata de un histograma que recoge las 200 frecuencias de secuencia más comunes de cada recombinación de familias V-J (para <i>IGH/IGK</i> y <i>TRB</i>) o de genes V-J (para <i>TRG</i>).

Tabla 7. Hojas de cálculo del archivo de salida de Excel

Libro de Excel completo para Leader, IGH FR1, IGH FR2, IGH FR3, IGK, TRB y TRG	
<p><i>Read Summary</i> (Resumen de lecturas)</p>	<p>Contiene una lista con las 200 secuencias únicas más comunes ordenadas por recuento e indica:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ En qué recombinación V-J encaja mejor cada secuencia ▪ Secuencia ▪ Tamaño de la secuencia ▪ % real de lecturas totales ▪ % acumulado de lecturas en todas las lecturas (solo TRG) ▪ % acumulado de lecturas en las 200 lecturas más comunes (IGH/IGK y TRB) ▪ Hasta qué punto la lectura abarca el gen V identificado como diana por los cebadores (%) (IGH/IGK) ▪ Secuencia putativa de CDR3 <p>Leader e IGH FR1 también contienen:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tasa de mutación para el gen V parcial (%) <p>Leader, IGH FR1, IGH FR2 e IGH FR3 también contienen:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ La predicción de que el reordenamiento se ajuste in-frame (Y/N/n/a) (S/N/N. P.). Si no puede indicarse el uso del segmento genético V o J debido a la mala calidad de la alineación, el software no podrá predecir si el gen se ajusta in-frame, por lo que el resultado será n/a (N. P.). La predicción de que el reordenamiento no contenga el codón de parada (Y/N) (S/N). Si no se puede realizar la predicción de ajuste in-frame, no se podrá indicar con precisión la presencia del codón de parada. ▪ Secuencia putativa de CDR3
<p><i>VJ Usage</i> (Uso de V-J)</p>	<p>Se trata de los recuentos sin procesar y las frecuencias de las 200 recombinaciones más comunes de las familias V-J (para IGH/IGK y TRB) o de los genes V-J (para TRG).</p>
<p><i>VJ Usage Percent Graph</i> (Gráfico de porcentaje de uso de V-J)</p>	<p>Se trata de un gráfico tridimensional que recoge las 200 frecuencias de secuencia más comunes de cada recombinación de las familias V-J (para IGH/IGK y TRB) o de los genes V-J (para TRG).</p>
<p><i>VJ Usage Raw Graph</i> (Gráfico bruto de uso de V-J)</p>	<p>Se trata de un gráfico tridimensional que recoge los 200 recuentos sin procesar más comunes de cada recombinación de las familias V-J (para IGH/IGK y TRB) o de los genes V-J (para TRG).</p>
<p><i>VJ Sequence Frequency</i> (Frecuencia de la secuencia V-J)</p>	<p>Se trata de un gráfico de barras apiladas de todas las posibles recombinaciones de las familias V-J (para IGH/IGK y TRB) o de los genes V-J (para TRG), cada una con una lista ordenada de las 200 lecturas más comunes (de mayor a menor %).</p>
<p><i>Unique Reads</i> (Lecturas individuales)</p>	<p>Archivo FASTQ con secuencias únicas ordenadas por recuento.</p>

Nota: IGH en la lista de la tabla anterior hace referencia a los análisis de Leader, IGH FR1, IGH FR2 e IGH FR3. Los gráficos de frecuencia de estas dianas génicas solo especifican IGH en el título. La carpeta de salida de datos indica si el software ha analizado Leader o una de las regiones marco (FR). Esta información aparece en el campo de ubicación del archivo de datos situado en la parte superior de la hoja de cálculo Read Summary (Resumen de lecturas).

Nota: El análisis de IGK incluye información sobre otros elementos del locus de IGK implicados en las recombinaciones (IGKINTR e IGKDEL).

Nota: El análisis de TRB incluye información sobre otros elementos del locus de TRB implicados en las recombinaciones de la región D-J.

Nota: Acerca de las 200 más comunes: si se especifica, las hojas de cálculo muestran las secuencias más comunes (hasta 200) para Leader, IGH FR1, IGH FR2, IGH FR3, TRB e IGK. Read Summary (Resumen de lecturas) recoge todas las secuencias para TRG.

Nota: La Putative CDR3 sequence (Secuencia putativa de CDR3) se determina haciendo coincidir una definición exacta de una secuencia de CDR3. Cualquier mutación de los puntos de anclaje o alteración del marco de lectura dará lugar a un valor *not found* (no encontrado).

¡IMPORTANTE! En ocasiones, las asignaciones de los genes V-J de *Read Summary* (Resumen de lecturas) pueden tener el valor *none* (ninguno). Estas asignaciones se basan en la calidad de la mejor alineación entre la lectura y los genes de referencia. Si la mejor alineación es inferior al límite de calidad, no se podrá establecer una asignación fiable de genes y se asignará el valor *none* (ninguno).

¡IMPORTANTE!

La tasa de mutación del gen V parcial (%) indicará *n/a* (*N.P.*) para *IGH* FR2 y FR3. La cobertura de los genes V es escasa debido al reducido tamaño de los amplicones de estas dianas, lo que da lugar a un cálculo impreciso de la tasa de mutación.

- Al analizar el estado de hipermutación somática de las muestras, céntrese en las 4 lecturas más comunes (limite las muestras monoclonales o biclonales a las 2-4 lecturas más comunes, respectivamente), ya que la tasa de hipermutación somática (HS) y los análisis de ajuste in-frame y del codón de parada ofrecen la máxima información para estas lecturas. Vista la naturaleza imparcial de las plataformas de SNG, se secuencian y analizan muchas más lecturas que las 4 primeras, la mayoría de las cuales son reordenamientos poco abundantes o pueden atribuirse a artefactos de la amplificación o secuenciación. En estos casos, los análisis de HS, ajuste in-frame y codón de parada no resultan útiles en las lecturas no clonales. Tenga en cuenta que Invivoscribe usa GRCh37 para hacer referencia a las secuencias, por lo que los resultados pueden diferir ligeramente de la base de datos IMGT. Además, el análisis no incluye muchos pseudogenes y genes no funcionales. Interprete con cautela los reordenamientos con un estado de hipermutación somática cercano al valor de corte del 2,0 %, en particular en el ensayo *IGH* FR1, que solo tiene como diana una parte de la región IGHV, ya que no evalúa la secuencia en sentido ascendente desde el punto de fijación del cebador.

9. Servicio técnico y atención al cliente

Damos a su negocio el valor que realmente tiene. Será un placer ayudarle a comprender cómo funciona el software. Proporcionamos asistencia técnica continuada de lunes a viernes para que pueda seguir usando los kits de ensayo en su laboratorio.

Datos de Contacto



Invivoscribe, Inc

10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego | California 92121-2711 | Estados Unidos

Teléfono: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Horario comercial: De 07:00 a 17:00 PST/PDT

Servicio técnico: support@invivoscribe.com | Atención al cliente: sales@invivoscribe.com | Sitio web: www.invivoscribe.com

10. Símbolos

Los siguientes símbolos se usan en el etiquetado de los productos SNG de Invivoscribe.

	Número de Catálogo		Fecha de Caducidad
	Volumen de Reactivo		Representante Autorizado en la Comunidad Europea
	Número de Lote		Consulte las instrucciones de uso
	Condiciones de Conservación		Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	Identificador Único de Dispositivo		Fabricante
	Conformidad del Reino Unido Evaluada		Persona Responsable del Reino Unido
	Representante Autorizado en Suiza		Conformidad Europea
	Aplicación de software		

11. Aviso Legal

Para estar al tanto de los avisos legales relacionados con este producto, visite: <https://invivoscribe.com/legal-notice/>

12. Preguntas frecuentes sobre el software

P1: ¿Por qué el *Read Summary (Resumen de lecturas)* de los análisis *IGH, IGK* o *TRB* contiene menos de 200 lecturas?

R1: LymphoTrack Dx Software – MiSeq alinea las 200 lecturas más comunes durante los análisis, pero *Read Summary (Resumen de lecturas)* solo recoge las lecturas que se han alineado con un gen V o J encontrado en la referencia. Las lecturas que no se alinean con la referencia, se excluyen del *Read Summary (Resumen de lecturas)*.

Los motivos por los que puede no producirse la alineación con la referencia son numerosos, pero suelen guardar relación con una muestra que genera una gran cantidad de amplificación no específica. Esto puede deberse a una cifra insuficiente de células diana en la muestra, a condiciones inadecuadas para la PCR o a la baja calidad de la muestra, como ocurre en el caso del FFPE fragmentado. Para reducir la posibilidad de que esto ocurra, siga las instrucciones de uso con precisión.

P2: ¿Por qué las asignaciones de V o J muestran un valor *none (ninguno)* en la tabla de *Read Summary (Resumen de lecturas)*?

R2: Para asignar una lectura a un gen V o J específico, se debe alcanzar un umbral mínimo de calidad durante la alineación. Si la alineación es deficiente, es imposible realizar una asignación fiable, por lo que se le atribuye un valor *none (ninguno)*. Como se indica en la pregunta 2, no es posible asignar un valor *none (ninguno)* a una lectura para ambos genes V y J; en este caso, dichas lecturas no aparecen en el informe.

P3: El *V-J Sequence Frequency Graph (Gráfico de frecuencia de las secuencias V-J)* presenta valores anómalos en el eje de ordenadas. La cifra correspondiente a *% total reads (% de lecturas totales)* es del orden de millones. ¿Cómo es posible?

R3: Es probable que haya seleccionado un separador decimal incorrecto para su región en el programa LymphoTrack Dx. Consulte el apartado 6 *Ejecución del software de análisis de datos* para saber cómo seleccionar el separador decimal correcto.

P4: Las hojas de cálculo con gráficos están vacías, pero las hojas de cálculo sin gráficos contienen datos. ¿Dónde se encuentran los gráficos?

R4: Esto puede deberse a que la dirección predeterminada de Excel esté configurada como *right-to-left (derecha a izquierda)* en lugar de *left-to-right (izquierda a derecha)*. Si las etiquetas de columna de una hoja de cálculo vacía comienzan en **A** en el lado derecho de la hoja, cambie la dirección a *left-to-right (izquierda a derecha)* antes de utilizar la macro de visualización de datos. Para cambiar esta configuración, acceda a *Excel Options (Opciones de Excel)* mediante el botón de **Office** situado en la esquina superior izquierda, haga clic en **Advanced (Opciones avanzadas)** y desplácese hasta el apartado *Display (Mostrar)*. Aquí verá la opción *Default direction (Dirección predeterminada)*. Seleccione **Left-to-right (Izquierda a derecha)** para visualizar los datos correctamente en las ejecuciones posteriores. Nota: Esto modificará la dirección permanentemente hasta que vuelva a cambiarla. El cambio no se revierte con solo cerrar el archivo de Excel.

P5: El programa se ha detenido después de hacer clic en *Launch Program (Iniciar programa)* y ha generado este error:

Application terminated with error: Filename not compatible. Please use only MSR software generated FASTQ files. (La aplicación finalizó con un error: nombre de archivo no compatible. Utilice solo archivos FASTQ generados por el software MSR de MiSeq.)

For help with this error, please contact Invivoscribe Technical Support. (Para saber más sobre este error, póngase en contacto con el servicio técnico de Invivoscribe.)

R5: LymphoTrack Dx Software – MiSeq espera archivos FASTQ pair end generados por el software MiSeq Reporter (MSR) integrado en la máquina de MiSeq. Si no se ha utilizado el software MSR para generar los archivos de secuencia, la llamada de bases debe realizarse mediante el software MSR. Consulte el Manual del usuario de MiSeq para obtener más información.

Es importante realizar la llamada de bases mediante el software MSR porque, aunque otros programas pueden ofrecer resultados muy similares (por ejemplo, BCL2GASTQ), también pueden generar resultados muy diferentes, en función de los parámetros específicos. El ensayo LymphoTrack Dx solo es válido cuando se analizan archivos FASTQ generados con el software MSR.

P6: ¿Por qué los resultados del análisis parecen abarcar menos lecturas de las esperadas?

R6: Si el Read Summary (Resumen de lecturas) indica que se han analizado ninguna o muy pocas lecturas totales, asegúrese de haber seleccionado el tipo de análisis correcto (Leader, *IGH FR1*, *IGH FR2*, *IGH FR3*, *IGK*, *TRB* o *TRG*) al ejecutar LymphoTrack Dx Software – MiSeq. Si el número de lecturas totales parece ser más bajo de lo normal, compare el tamaño de los archivos FASTQ analizados con el tamaño de los archivos FASTQ presentes en el instrumento MiSeq. Si el tamaño de los archivos del instrumento MiSeq es mayor, vuelva a transferir los datos de la secuencia para garantizar el análisis del conjunto de datos completo.

El secuenciador de MiSeq muestra diferentes mensajes al procesar los datos de secuenciación. Uno puede indicar *Sequencing Complete (Secuenciación completa)*; otro posterior puede señalar *Analysis Complete (Análisis finalizado)*. Transferir datos FASTQ entre estos dos mensajes puede dar lugar a un análisis incompleto de LymphoTrack Dx.

P7: ¿Por qué una de las diez lecturas más comunes del Read Summary (Resumen de lecturas) no aparece en el Merged Read Summary (Resumen de lecturas combinadas)?

R7: Es posible que la lectura *desaparecida* se haya combinado con otra con mejor calificación, o que la alineación de esta lectura haya sido excepcionalmente deficiente. Durante el proceso de combinación, las lecturas del resumen de lecturas se alinean con las del archivo de lecturas individuales; sin embargo, las lecturas del resumen de lecturas se han orientado para que coincidan con la alineación de la referencia, y posiblemente estén orientadas en sentido contrario en comparación con el gen de referencia. Esto solo sucede cuando la alineación es muy deficiente y cuando las alineaciones en el mismo sentido y en sentido contrario son casi equivalentes pero la segunda es algo mejor. En casos como estos, lo mejor es ignorar por completo la lectura.

IMPORTANTE: Utilice únicamente las lecturas del *Merged Read Summary (Resumen de lecturas combinadas)* para determinar evidencias de clonalidad.

P8: ¿Por qué tarda tanto en finalizar el análisis (más de una hora por muestra)?

R8: El archivo de registro ofrece un desglose del tiempo empleado en realizar cada paso. Tras la fila *INFO: Decompressing files (INFORMACIÓN: Descompresión de archivos)*, aparece otra que indica cuántos archivos se han descomprimido y en cuánto tiempo. Esta cifra se expresa en milisegundos. Si el equipo tarda varias horas en descomprimir, compruebe si los archivos de destino están en un servidor de archivos. Por lo general, ejecutar un proceso intensivo de E/S como la descompresión en una red es mucho más lento. Si es posible, copie los archivos en el equipo informático local o descomprima los archivos directamente antes de ejecutar el software. Asegúrese de que los archivos comprimidos y descomprimidos no estén en la misma carpeta. El software no funcionará correctamente si tanto los archivos FASTQ como los FASTQ.GZ están en la carpeta de destino.

Si el software tarda mucho en realizar los siguientes pasos del análisis, es posible que los archivos FASTQ sean muy grandes. Un ejemplo de archivo FASTQ grande sería aquél que incluye menos de 24 índices en una sola serie de MiSeq y, como resultado, las muestras secuenciadas presentan una profundidad de cobertura mayor. Un segundo ejemplo sería si la genoteca está desequilibrada y contiene una mayor proporción de una muestra con un solo índice frente a la proporción de muestras con otros índices. La duración prevista en estas instrucciones de uso presupone series de 24 índices con genotecas equilibradas.

P9: El Q30 de la serie comunicado por el instrumento MiSeq no satisface las especificaciones de Illumina. Si se ejecuta el análisis LymphoTrack y los controles parecen funcionar de la forma prevista, ¿realmente ha fallado el análisis?

R9: El Q30 de la serie se calcula en tiempo real durante el proceso de llamada de bases. En ese momento, no se ha llevado a cabo ningún otro procesamiento de los datos, como la desmultiplicación y el ajuste del adaptador. Esto significa que cualquier secuencia procedente de un índice de baja calidad o que ocurra fuera de la secuencia del adaptador contribuye a la puntuación Q30. La secuencia hallada fuera de la secuencia del adaptador suele ser de baja calidad; esta situación se produce a menudo con dímeros de primers. Las genotecas con un nivel suficiente de dímeros de primers pueden dar lugar a una caída del valor Q30 de la serie. Como comprobación secundaria, la salida de LymphoTrack Reporter muestra la puntuación Q30 del índice calculada a partir de todas las lecturas ajustadas de ese índice. Asimismo, si la puntuación Q30 de un índice no satisface las especificaciones de Illumina, considere ese índice como fallido.

Q10: ¿ Por qué los 10 conteos de lectura combinados principales son diferentes cuando se vuelven a analizar los mismos datos?

A10: Los 10 conteos de lectura combinados principales pueden variar ligeramente cuando se analiza la información varias veces debido al ordenamiento de las secuencias cuando hay múltiples secuencias con el mismo conteo de lectura exacto. En casos donde varias secuencias tienen conteos idénticos, el software puede ordenarlas y clasificarlas de manera aleatoria. Las diferencias observadas deberían ser insignificantes y no afectar la interpretación de los resultados.