



Este documento y su contenido son propiedad exclusiva 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 usarán ni distribuirán con ningún otro fin ni tampoco se comunicarán, divulgarán ni reproducirán en ninguna otra forma sin el consentimiento previo por escrito de Illumina. Illumina no transfiere mediante este documento ninguna licencia bajo sus derechos de patente, marca comercial, copyright ni derechos de autor o similares derechos de terceros.

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

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

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

© 2021 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

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

## Historial de revisiones

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de material 20006818 N.º de documento 15046563 v07	Octubre de 2021	Se han incluido 3 filtros de aire de repuesto en la sección Sustitución del filtro de aire Se han incluido cartuchos nuevos y antiguos en el manual
N.º de material 20006818 N.º de documento 15046563 v06	Junio de 2019	Se ha añadido información de grupo de trabajo para BaseSpace Sequence Hub durante la configuración del experimento. Se ha añadido información de la ruta UNC para la carpeta de resultados. Se han añadido soluciones de problemas para los errores de almacenamiento en red. Se ha aclarado que las direcciones de los filtros de aire son para instrumentos con un filtro accesible desde el panel trasero. Se ha actualizado la ubicación de los archivos de la carpeta raíz a las carpetas específicas del experimento de la carpeta de resultados.

Documento	Fecha	Descripción del cambio
<p>N.º de material 20006818 N.º de documento 15046563 v05</p>	<p>Diciembre de 2018</p>	<p>Se han actualizado las descripciones de software, pantallas y flujo de trabajo de NextSeq Control Software (NCS) 4.0.</p> <p>Se ha actualizado la siguiente información adicional de NCS 4.0.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se ha añadido información en el software Local Run Manager.</li> <li>• Se ha actualizado la información BaseSpace, que ahora se denomina BaseSpace Sequence Hub. La ficha Prep (Preparación) de BaseSpace y BaseSpace Onsite ya no están disponibles.</li> <li>• Se han añadido instrucciones sobre la selección de Local Run Manager o el modo de experimento manual. El modo manual sustituye el modo independiente, con algunas modificaciones.</li> <li>• Se ha añadido la opción de comprobar las actualizaciones del software del instrumento en BaseSpace Sequence Hub.</li> <li>• Se han añadido Local Run Manager, el servicio de copia universal y el controlador de acceso directo a la memoria a la descripción del paquete System Suite. Se han retirado BaseSpace Broker y SAV.</li> <li>• El servicio de copia de experimentos es ahora el servicio de copia universal.</li> <li>• Se ha añadido la opción de habilitar fórmulas personalizadas al cargar el cartucho de reactivos.</li> <li>• Se ha retirado la descripción de la celda de flujo cuando se supervisa el progreso del experimento.</li> <li>• Se ha retirado la opción de seleccionar encendido para el modo de pantalla completa y de Windows.</li> <li>• Se han añadido instrucciones de mantenimiento de instrumentos con una actualización del filtro de aire.</li> <li>• Se han añadido nuevos iconos para la atención, información y minimización de NCS.</li> <li>• Se han actualizado las instrucciones para la personalización de los ajustes del experimento y los ajustes del sistema.</li> <li>• Se ha actualizado la opción de enviar datos de rendimiento del instrumento.</li> <li>• Se han actualizado los iconos de transferencia de datos.</li> <li>• Se ha aclarado que, en el caso de la adquisición de imágenes, los archivos en cola para la transferencia no tienen límite de tiempo.</li> <li>• Se han corregido las referencias de BSM a Mecanismo de aspiración del tampón en la información de las comprobaciones de movimiento.</li> </ul> <p>Se ha añadido metanol o alcohol isopropilo (99 %) de grado reactivo o espectrofotométrico para el mantenimiento del instrumento.</p>
<p>N.º de material 20006818 N.º de documento 15046563 v04</p>	<p>Mayo de 2018</p>	<p>Se ha añadido asistencia para los reactivos de NextSeq v2.5.</p> <p>Se ha actualizado la información de almacenamiento/envío para NextSeq v2.5 Reagent Kits que envían celdas de flujo a temperaturas ambiente. Para las celdas de flujo de NextSeq v2.5 se siguen manteniendo las condiciones de almacenamiento previas.</p> <p>Se ha añadido información sobre NextSeq v2.5 Reagent Kits que requieren las actualizaciones del software a la versión 2.2.</p> <p>Se ha añadido una nota sobre la concentración de carga del kit de rendimiento medio.</p> <p>Se ha añadido una nota sobre el almacenamiento de las celdas de flujo.</p> <p>Se ha añadido una nota en la que se recomienda el uso de celdas de flujo de rendimiento elevado para las comprobaciones del sistema.</p>

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de material 20006818 N.º de documento 15046563 v03	Marzo de 2018	Se ha eliminado el nombre de usuario y la contraseña predeterminados necesarios para iniciar sesión en el sistema operativo. Illumina recomienda usar credenciales específicas del centro. Se ha añadido información relativa al servicio de supervisión Illumina Proactive en la sección Selección de configuración de BaseSpace. Se han actualizados las referencias del software RTA v2 a RTA2.
N.º de material 20006818 N.º de documento 15046563 v02	Marzo de 2016	Se ha añadido la sección Consideraciones sobre el indexado. Se han eliminado los pasos para inspeccionar la celda de flujo. Se han especificado la concentración y el volumen de carga en el paso de Carga de bibliotecas en el cartucho de reactivos.
N.º de material 20001879 N.º de documento 15046563 v01	Octubre de 2015	Se ha especificado que un equivalente del proveedor recomendado de NaOCl es un equivalente de laboratorio. Se ha añadido una recomendación para el servicio de mantenimiento preventivo anual. Se ha reorganizado la información de los capítulos Descripción general y Primeros pasos. Se han añadido instrucciones para la personalización de la configuración del sistema. Se han eliminado las instrucciones de Live Help del capítulo Solución de problemas. Esta función se ha eliminado del software de control.
N.º de referencia 15046563 Rev. I	Mayo de 2015	Se ha corregido la descripción de los depósitos reservados en el cartucho de reactivos.
N.º de referencia 15046563 Rev. H	Mayo de 2015	Se ha corregido el volumen de Tween 20 presente en la solución de lavado que se usa para los lavados manuales. Se ha reestructurado la información acerca de las opciones de configuración del sistema. Se ha trasladado la información acerca del software de análisis en tiempo real al Apéndice A.

Documento	Fecha	Descripción del cambio
<p>N.º de referencia 15046563 Rev. G</p>	<p>Febrero de 2015</p>	<p>Se han actualizado las descripciones de software de acuerdo con NextSeq Control Software v1.4.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se han añadido las opciones de lavado manual: lavado rápido y lavado manual posterior al experimento.</li> <li>• Se ha añadido la descripción de las funciones de personalización del experimento para purgar consumibles al final del experimento y omitir la confirmación de la comprobación previa al experimento.</li> <li>• Se ha añadido la opción para cancelar y reiniciar una comprobación previa al experimento.</li> <li>• Se ha añadido la opción para habilitar la supervisión del experimento en el modo independiente.</li> <li>• Se ha eliminado la descripción de los archivos de desplazamientos y de fase de hebra retrasada, que ya no se guardan en la carpeta del experimento.</li> <li>• Se ha actualizado la imagen del diagrama de dispersión para mostrar unas llamadas de bases con una distribución más uniforme al usar la versión 1.4 del software del sistema.</li> <li>• Se ha añadido la descripción del servicio de copia del experimento.</li> <li>• Se ha añadido una opción de uso de un cebador personalizado del índice 2, posible con NextSeq 500 Kit v2. Para obtener más información, consulte la <i>Guía de cebadores personalizados de NextSeq</i> (n.º de documento 15057456).</li> </ul> <p>Se han actualizado las instrucciones de preparación de reactivos para usar NextSeq 500 Kit v2: se han eliminado los pasos manuales para cargar hipoclorito de sodio y cebadores de doble índice en el cartucho de reactivos. Estos reactivos vienen precargados en el cartucho de reactivos v2. Para obtener más información, consulte la <i>Guía de referencia de NextSeq 500/550 Kit v2</i> (n.º de documento 15058065).</p> <p>Se ha añadido la sección de consumibles de secuenciación que enumera las versiones de kit, las versiones de NCS compatibles y el nombre y número de referencia de la guía de referencia del kit correspondiente.</p> <p>Se han actualizado los consumibles proporcionados por el usuario para especificar los usos de NaOCl para las opciones de lavado manual introducidas en el NCS v1.4.</p> <p>Se han corregido los requisitos de los grupos que superan el filtro a no más de una llamada de bases por debajo de la cantidad en los primeros 25 ciclos.</p> <p>Se ha añadido un volumen de 120 ml de agua de laboratorio a las instrucciones de comprobación del sistema.</p>
<p>N.º de referencia 15046563 Rev. F</p>	<p>Septiembre de 2014</p>	<p>Se han corregido las descripciones de las funciones de NextSeq Control Software v1.3.</p> <p>Se ha actualizado la URL de las hojas de datos de seguridad (SDS, Safety Data Sheets) en <a href="http://support.illumina.com/sds.html">support.illumina.com/sds.html</a>.</p> <p>Se han actualizado las marcas de producto de NextSeq de ™ a ®.</p>

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de referencia 15046563 Rev. E	Agosto de 2014	<p>Se han actualizado las descripciones de software de NextSeq Control Software v1.3:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se han actualizado las descripciones de los comandos System Customization (Personalización del sistema) y Software Updates (Actualizaciones de software) de la pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento).</li> <li>• Se ha actualizado la descripción de la pantalla Pre-Run Check (Comprobación previa al experimento), que agrupa los elementos de comprobación en cuatro categorías ampliables.</li> <li>• Se han actualizado las instrucciones de Live Help para acceder a Live Help mediante la URL. El icono de la pantalla Home (Inicio) no está disponible en NCS v1.3.</li> <li>• Se ha añadido el procedimiento de rehibridación integrado en el instrumento para rehibridar el cebador de Lectura 1. La opción de rehibridar una celda de flujo es compatible con NCS v1.3 o una versión posterior y requiere un cartucho de reactivos nuevo y un cartucho de tampones nuevo.</li> </ul> <p>Se ha añadido la <i>Guía de cebadores personalizados de NextSeq (n.º de documento 15057456)</i> para enumerar los recursos adicionales.</p>
N.º de referencia 15046563 Rev. D	Junio de 2014	<p>Se han añadido instrucciones para cargar BP13 en la posición n.º 18 del cartucho de reactivos al realizar experimentos de doble índice. Se ha corregido el ciclo en el que aparecen los criterios de medición de densidad de grupos, es decir, el ciclo 25.</p> <p>Se han corregido las posiciones del cartucho de reactivos para cebadores personalizados como posición n.º 7 (Lectura 1), n.º 8 (Lectura 2) y n.º 9 (Índice 1).</p> <p>Se ha añadido una nota sobre los daños que se pueden producir al cambiar la posición del instrumento tras la instalación. Póngase siempre en contacto con su representante de Illumina antes de cambiar de posición el instrumento.</p> <p>Se ha actualizado la URL de las hojas de datos de seguridad (SDS) en <a href="http://support.illumina.com/sds.ilmn">support.illumina.com/sds.ilmn</a>.</p>

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de referencia 15046563 Rev. C	Abril de 2014	<p>Se han actualizado las descripciones de software de NextSeq Control Software v1.2 y RTA v2.1:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se ha añadido el nombre de fórmula NextSeq Mid (Medio) para su uso con el NextSeq 500 Mid Output Kit.</li> <li>• Se han eliminado las instrucciones para añadir NaOCl al cartucho de lavado de tampones para un lavado manual.</li> <li>• Se ha corregido el volumen NaOCl a 3 ml para la posición n.º 28 del cartucho de reactivos, que se requiere para el lavado automático posterior al experimento.</li> <li>• Se ha indicado que los nombres de experimentos largos aparecen en un campo con barra de desplazamiento de la pantalla Run Setup (Configuración del experimento).</li> <li>• Se ha indicado que RTA v2 no aplica las correcciones de fase de hebra retrasada y fase de hebra adelantada en las lecturas de índice.</li> <li>• Se ha añadido la descripción de los archivos de registro a la lista de archivos usada para solucionar problemas.</li> <li>• Se han añadido instrucciones para el vaciado de un contenedor lleno de reactivos usados durante un experimento.</li> <li>• Se ha añadido la descripción de las carpetas de fórmulas, incluida la ubicación de las fórmulas personalizadas.</li> <li>• Se ha añadido la descripción de comprobaciones térmicas de ventiladores y sondas térmicas.</li> </ul>



Documento	Fecha	Descripción del cambio
<p>N.º de referencia 15046563 Rev. B</p>	<p>Febrero de 2014</p>	<p>Se han actualizado las descripciones de software de NextSeq Control Software v1.1:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se ha añadido la función de búsqueda en la pantalla Run Setup (Configuración del experimento) para el filtrado de la lista de experimentos disponibles.</li> <li>• Se ha añadido NextSeq High (Elevado) o NextSeq Mid (Medio) en las fórmulas disponibles en función del tipo de celda de flujo.</li> <li>• Se ha indicado que las actualizaciones de software incluyen el acuerdo de licencia, las notas de la versión y la lista de actualizaciones de software.</li> <li>• Se ha añadido la descripción del mensaje de error de RAID.</li> <li>• Se ha indicado que el botón Exit (Salir) cierra NSS y reinicia NCS de forma automática al final de una comprobación del sistema.</li> </ul> <p>Se ha añadido el tiempo de almacenamiento de los reactivos hasta una semana a 4 °C.</p> <p>Se ha actualizado la etiqueta del cartucho de reactivos para el depósito n.º 10 en Load Library Here (Cargar biblioteca aquí).</p> <p>Se ha actualizado la lista de consumibles proporcionados por el usuario para especificar una solución de hipoclorito de sodio al 3 %-6 % y el número de catálogo de un proveedor.</p> <p>Se han actualizado las instrucciones para la preparación de una dilución de NaOCl al 0,06 % para lavados del instrumento, que incluye una reducción del volumen a 2 ml y una concentración inicial al 3 %-6 %.</p> <p>Se han añadido ilustraciones para mostrar la colocación correcta e incorrecta de la pinza en la celda de flujo.</p> <p>Se ha actualizado el capítulo Análisis en tiempo real para la inclusión de una descripción general de RTA v2, la estructura de carpetas de resultados y el proceso de llamada de bases.</p> <p>Se ha actualizado el capítulo Solución de problemas para la inclusión de los errores de RTA v2 y la inclusión de RunParameters.xml en la lista de archivos de solución de problemas.</p>
<p>N.º de referencia 15046563 Rev. A</p>	<p>Enero de 2014</p>	<p>Publicación inicial.</p>

# Índice

Capítulo 1 Descripción general .....	1
Introducción .....	1
Otros recursos .....	1
Componentes del instrumento .....	2
Descripción general de los consumibles de secuenciación .....	6
Capítulo 2 Primeros pasos .....	10
Puesta en servicio del instrumento .....	10
Personalización de los ajustes del sistema .....	11
Personalización de los ajustes del experimento .....	12
Consumibles y equipos proporcionados por el usuario .....	13
Capítulo 3 Secuenciación .....	15
Introducción .....	15
Creación de un experimento con el software Local Run Manager .....	16
Creación de un experimento con NCS .....	16
Preparación del cartucho de reactivos .....	16
Preparación de la celda de flujo .....	17
Preparación de bibliotecas para la secuenciación .....	18
Configuración de un experimento de secuenciación .....	19
Supervisión del progreso del experimento .....	26
Lavado automático posterior al experimento .....	28
Capítulo 4 Mantenimiento .....	29
Introducción .....	29
Realización de un lavado manual .....	29
Sustitución del filtro de aire .....	32
Actualizaciones de software .....	33
Apagado del instrumento .....	35
Apéndice A Resolución de problemas .....	36
Introducción .....	36
Archivos de solución de problemas .....	36
Solución de errores de la comprobación automática .....	37
Contenedor de reactivos usados lleno .....	38
Flujo de trabajo de la rehibridación .....	39
Fórmulas personalizadas y carpetas de fórmulas .....	41
Comprobación del sistema .....	41
Mensaje de error de RAID .....	43
Error de almacenamiento en red .....	44
Configuración de ajustes del sistema .....	44
Apéndice B Análisis en tiempo real .....	47

Descripción general de Análisis en tiempo real .....	47
Flujo de trabajo de análisis en tiempo real .....	48
Archivos de resultados de secuenciación .....	52
Placas de la celda de flujo .....	52
Estructura de la carpeta de resultados .....	56
Índice alfabético .....	57
Asistencia técnica .....	60

# Capítulo 1 Descripción general

Introducción .....	1
Otros recursos .....	1
Componentes del instrumento .....	2
Descripción general de los consumibles de secuenciación .....	6

## Introducción

El sistema NextSeq™ 500 de Illumina® combina la potencia de la secuenciación de rendimiento elevado con la sencillez de un secuenciador de escritorio.

## Funciones

- ▶ **Secuenciación de rendimiento elevado:** NextSeq 500 permite realizar secuenciaciones de exomas, genomas completos y transcriptomas y admite bibliotecas TruSeq™, TruSight™ y Nextera™.
- ▶ **Tipos de celdas de flujo:** las celdas de flujo están disponibles en configuraciones que permiten un rendimiento elevado y medio. Cada tipo de celda de flujo se suministra en un kit con un cartucho de reactivos precargado compatible.
- ▶ **Análisis en tiempo real (RTA, Real-Time Analysis):** el software de análisis integrado lleva a cabo un análisis de datos integrado en el instrumento, que incluye el análisis de imágenes y las llamadas de bases. NextSeq usa una implementación de RTA llamada RTA v2, que incluye diferencias importantes en materia de arquitectura y funciones. Para obtener más información, consulte *Análisis en tiempo real en la página 47*.
- ▶ **Análisis basado en la nube con BaseSpace™ Sequence Hub:** el flujo de trabajo de secuenciación se encuentra integrado en BaseSpace Sequence Hub, el entorno informático basado en la nube de Illumina para la supervisión de experimentos, el análisis de datos y la colaboración. En el curso del experimento, los archivos de resultados se envían en tiempo real a BaseSpace Sequence Hub para su análisis.
- ▶ **Análisis de datos integrado en el instrumento:** el software Local Run Manager analiza los datos del experimento de acuerdo con el módulo de análisis especificado para el experimento.

## Otros recursos

La documentación siguiente está disponible para descargar en el sitio web de Illumina.

Recurso	Descripción
<i>Guía de preparación del centro para NextSeq System (n.º de documento 15045113)</i>	Proporciona especificaciones del espacio del laboratorio, los requisitos eléctricos y las consideraciones medioambientales.
<i>Guía de cumplimiento y seguridad de NextSeq System (n.º de documento 15046564)</i>	Proporciona información sobre las consideraciones de seguridad operativa, las declaraciones de cumplimiento normativo y el etiquetado del instrumento.
<i>Guía del usuario del lector de RFID, n.º de modelo TR-001-44 (n.º de documento 15041950)</i>	Proporciona información sobre el lector de RFID del instrumento, las certificaciones de cumplimiento y las consideraciones de seguridad.
<i>Desnaturalización y dilución de bibliotecas para NextSeq System (n.º de documento 15048776)</i>	Proporciona instrucciones para la desnaturalización y dilución de bibliotecas preparadas para un experimento de secuenciación y la preparación de un control PhiX opcional. Este paso se aplica a la mayoría de los tipos de bibliotecas.

Recurso	Descripción
<i>Guía de cebadores personalizados de NextSeq (n.º de documento 15057456)</i>	Proporciona información sobre el uso de cebadores de secuenciación personalizados en lugar de cebadores de secuenciación de Illumina.
<i>Centro de ayuda de BaseSpace</i>	Proporciona información sobre el uso de BaseSpace™ Sequence Hub y las opciones de análisis disponibles.
<i>Guía del software Local Run Manager (n.º de documento 100000002702)</i>	Proporciona un resumen del software Local Run Manager e instrucciones para el uso de las funciones del software.

Visite la [página de asistencia de NextSeq 500](#) del sitio web de Illumina para acceder a la documentación, las descargas de software, la formación en línea y las preguntas frecuentes.

## Componentes del instrumento

El sistema NextSeq 500 cuenta con un monitor con pantalla táctil, una barra de estado y cuatro compartimentos.

**Figura 1** Componentes del instrumento



- A **Monitor con pantalla táctil:** permite la configuración integrada en el instrumento y el ajuste mediante el uso de la interfaz del software de control.
- B **Barra de estado:** indica el estado del instrumento, es decir, si está en funcionamiento (azul), si requiere asistencia (naranja), si está listo para la secuenciación (verde) o si se debe realizar un lavado en las próximas 24 horas (amarillo).
- C **Compartimento de tampones:** alberga el cartucho de tampones y el contenedor de reactivos usados.
- D **Compartimento de reactivos:** alberga el cartucho de reactivos.
- E **Botón de encendido/apagado:** enciende el instrumento y apaga o enciende el ordenador del instrumento.
- F **Compartimento de adquisición de imágenes:** alberga la celda de flujo durante un experimento de secuenciación.
- G **Compartimento del filtro de aire:** sostiene el filtro de aire para instrumentos con un filtro accesible desde el panel trasero.

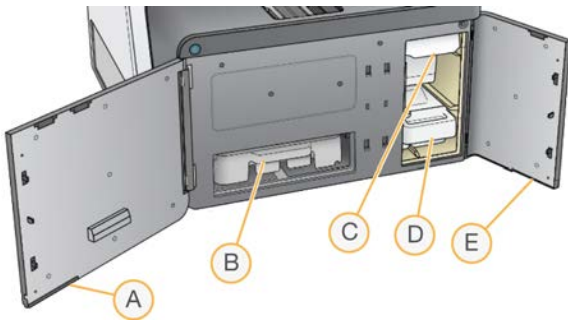
## Compartimento de adquisición de imágenes

El compartimento de adquisición de imágenes aloja la platina, que incluye tres pasadores de alineación para colocar la celda de flujo. Una vez cargada la celda de flujo, la puerta del compartimento de adquisición de imágenes se cierra de forma automática y desplaza los componentes hasta su sitio.

## Compartimentos de reactivos y tampones

La configuración de un experimento de secuenciación en NextSeq 500 requiere acceso al compartimento de reactivos y al compartimento de tampones para efectuar la carga de los consumibles del experimento y el vaciado del contenedor de reactivos usados.

**Figura 2** Compartimentos de reactivos y tampones



- A **Puerta del compartimento de reactivos:** cierra el compartimento de reactivos con un cierre situado debajo de la esquina inferior derecha de la puerta. El compartimento de reactivos alberga el cartucho de reactivos. Los reactivos se bombean y pasan por los dispensadores y el sistema de fluídica y, a continuación, van a la celda de flujo.
- B **Cartucho de reactivos:** el cartucho de reactivos es un consumible precargado de un solo uso.
- C **Cartucho de tampones:** el cartucho de tampones es un consumible precargado de un solo uso.
- D **Contenedor de reactivos usados:** los reactivos usados se recogen para su desecho después de cada experimento.
- E **Puerta del compartimento de tampones:** cierra el compartimento de tampones con un cierre situado debajo de la esquina inferior izquierda de la puerta.

## Compartimento del filtro de aire

El compartimento del filtro de aire sostiene el filtro de aire para instrumentos con un filtro accesible desde el panel trasero. Sustituya el filtro de aire cada 90 días. Para obtener información sobre la sustitución del filtro, consulte [Sustitución del filtro de aire en la página 32](#).

## NextSeq Software

El software del instrumento cuenta con aplicaciones integradas que efectúan experimentos de secuenciación.






- ▶ **NextSeq Control Software (NCS):** controla el funcionamiento del instrumento y le guía por los pasos de configuración de un experimento de secuenciación.
  - ▶ El software está preinstalado en el sistema NextSeq y se ejecuta integrado en el instrumento. El NCS realiza el experimento de acuerdo con los parámetros especificados en el módulo del software Local Run Manager o en el NCS.


- ▶ Antes de comenzar el experimento de secuenciación, seleccione un experimento que haya creado con el módulo Local Run Manager o en el NCS. La interfaz del software NCS le guía en los pasos de carga de la celda de flujo y los reactivos.
- ▶ Durante el experimento, el software pone en funcionamiento la platina de la celda de flujo, dispensa reactivos, controla la fluídica, establece las temperaturas, captura imágenes de los grupos de la celda de flujo y ofrece un resumen visual de las estadísticas de calidad. Puede supervisar el experimento en el NCS o en Local Run Manager.
- ▶ Durante el experimento, que puede supervisar en el NCS o en Local Run Manager, el NCS realiza las siguientes funciones.
  - ▶ Pone en funcionamiento la platina de la celda de flujo
  - ▶ Dispensa reactivos
  - ▶ Controla la fluídica
  - ▶ Establece las temperaturas
  - ▶ Captura imágenes de los grupos de la celda de flujo
  - ▶ Ofrece un resumen visual de las estadísticas de calidad
- ▶ **Software Local Run Manager:** solución de software integrada para crear un experimento y analizar los resultados (análisis secundario). El software también proporciona un seguimiento de la muestra y controla los permisos de los usuarios.
- ▶ **Software de análisis en tiempo real (RTA):** el RTA realiza análisis de imágenes y llamadas de bases durante el experimento. NextSeq 500 usa RTA v2, que incluye diferencias importantes en su arquitectura y funciones con respecto a versiones anteriores. Para obtener más información, consulte [Análisis en tiempo real en la página 47](#).
- ▶ **Servicio de copia universal:** copia los archivos de resultados de secuenciación de la carpeta de experimentos a la carpeta de resultados y a BaseSpace Sequence Hub (si corresponde), donde puede acceder a ellos.

El análisis en tiempo real (RTA) y el servicio de copia universal solo ejecutan procesos en segundo plano.

## Iconos de estado

Un icono de estado situado en la esquina superior derecha de la pantalla de interfaz del software de control indica cualquier cambio de condiciones durante la configuración del experimento o durante el experimento.


Icono de estado	Nombre de estado	Descripción
	Estado correcto	El sistema está normal.
	Procesando	El sistema está procesando.
	Advertencia	Se ha producido una advertencia. Las advertencias no detienen un experimento ni requieren una acción antes de continuar.
	Error	Se ha producido un error. Los errores precisan una acción antes de continuar con el experimento.
	Atención	Hay una notificación que precisa su atención. Consulte el mensaje para obtener más información.

Icono de estado	Nombre de estado	Descripción
	Información	Un solo mensaje informativo. No se requiere ninguna acción.

Cuando se produce un cambio en las condiciones, el icono parpadea para alertarle. Seleccione el icono para visualizar una descripción del estado. Seleccione **Acknowledge** (Aceptar) para aceptar el mensaje y **Close** (Cerrar) para cerrar el cuadro de diálogo.

## Icono de la barra de navegación

El icono de minimización de NCS se encuentra en la esquina superior derecha de la interfaz del software de control.

Icono de acceso	Nombre del icono	Descripción
	Minimización de NCS	Seleccione Minimize NCS (Minimización de NCS) para acceder a las aplicaciones y carpetas de Windows.

## Botón de encendido/apagado

El botón de encendido que se encuentra en la parte delantera del sistema NextSeq enciende la alimentación del instrumento y de su ordenador. El botón de encendido/apagado lleva a cabo las siguientes acciones en función del estado de alimentación del instrumento.

Estado de alimentación	Acción
El instrumento está apagado	Pulse brevemente el botón para encender la alimentación.
El instrumento está encendido	Pulse brevemente el botón para apagar la alimentación. Aparece un cuadro de diálogo en la pantalla para confirmar un apagado normal del instrumento.
El instrumento está encendido	Mantenga pulsado el botón de encendido durante 10 segundos para provocar un apagado forzado del instrumento y su ordenador. Use este método para apagar el instrumento solo si no responde.



### NOTA

El apagado del instrumento durante un experimento de secuenciación finaliza el experimento de forma inmediata. La finalización de un experimento es definitiva. Los consumibles del experimento no se pueden reusar y los datos de secuenciación del experimento no se guardan.

## Requisitos de contraseña de Windows

El sistema operativo precisa un cambio de contraseña de Windows cada 180 días. Cuando se le pida, actualice su contraseña de Windows. Si usa Local Run Manager para el análisis, actualice también la contraseña para la cuenta de Windows en Local Run Manager. Consulte la sección Especificación de la configuración de la cuenta de servicio en la *Guía del software Local Run Manager (n.º de documento 100000002702)*.



## Descripción general de los consumibles de secuenciación

### Contenido y almacenamiento

Los consumibles de secuenciación necesarios para ejecutar el instrumento NextSeq se proporcionan por separado en un kit de un solo uso. Cada kit incluye una celda de flujo, un cartucho de reactivos, un cartucho de tampones y un tampón de dilución de bibliotecas. Cuando recibe NextSeq 500 Kit:

- ▶ No abra el embalaje metálico de la celda de flujo hasta que se le indique.
- ▶ Almacene rápidamente los componentes a las temperaturas indicadas para garantizar un rendimiento adecuado.
- ▶ Almacene los cartuchos con las etiquetas de los embalajes orientadas hacia arriba.

Consumible	Cantidad	Temperatura de almacenamiento	Descripción
cartucho de reactivos	1	Entre -25 °C y -15 °C	Contiene reactivos de secuenciación y generación de grupos
cartucho de tampones	1	Entre 15 °C y 30 °C	Contiene solución de lavado y tampón
HT1	1	Entre -25 °C y -15 °C	Tampón de hibridación
celda de flujo	1	Entre 2 °C y 8 °C*	Celda de flujo de un solo uso

\* Se envía a temperatura ambiente para los kits de reactivos de NextSeq v2.5

Los reactivos son fotosensibles. Almacene el cartucho de reactivos y el cartucho de tampones en un lugar oscuro alejado de la luz.

La celda de flujo, el cartucho de reactivos y el cartucho de tampones usan la identificación por radiofrecuencia (RFID, Radio-Frequency Identification) para ofrecer precisión en la compatibilidad y el seguimiento de los consumibles.

Todos los demás kits incluyen cebadores de secuenciación de doble índice y NaOCl en el cartucho precargado. No se requieren pasos adicionales.





#### PRECAUCIÓN

Los kits de reactivos de NextSeq v2.5 requieren NCS v2.2 o una versión posterior. Asegúrese de que han finalizado las actualizaciones de software antes de preparar las muestras y los consumibles.

### Etiquetado y compatibilidad del kit

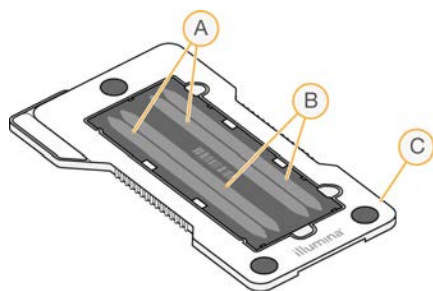
Los componentes del kit están etiquetados con indicadores codificados por colores que indican la compatibilidad entre las celdas de flujo y los cartuchos de reactivos. Use siempre una celda de flujo y un cartucho de reactivos compatibles. El cartucho de tampones es universal.

Todas las celdas de flujo y los cartuchos de reactivos vienen etiquetados con **High** (Elevado) o **Mid** (Medio). Compruebe siempre la etiqueta cuando prepare los consumibles para un experimento.

Tipo de kit	Marcado de la etiqueta
Componentes del kit de rendimiento elevado	
Componentes del kit de rendimiento medio	

## Descripción general de la celda de flujo

**Figura 3** Cartucho de la celda de flujo



- A Par de carriles A: carriles uno y tres
- B Par de carriles B: carriles dos y cuatro
- C Marco del cartucho de la celda de flujo

La celda de flujo es un sustrato elaborado con cristal en el que se generan grupos y se lleva a cabo la reacción de secuenciación. La celda de flujo está revestida por el cartucho de la celda de flujo.

La celda de flujo contiene cuatro carriles y la adquisición de imágenes se realiza de dos en dos.

- ▶ Las imágenes de los carriles uno y tres (par de carriles A) se adquieren al mismo tiempo.
- ▶ Las imágenes de los carriles dos y cuatro (par de carriles B) se adquieren tras finalizar la adquisición de imágenes del par de carriles A.

Aunque la celda de flujo tiene cuatro carriles, en la celda de flujo se secuencian una sola biblioteca o un conjunto de bibliotecas agrupadas solamente. Las bibliotecas se cargan en el cartucho de reactivos en un único depósito y se transfieren automáticamente a la celda de flujo en los cuatro carriles.

Las imágenes de cada carril se adquieren en áreas de adquisición de imágenes pequeñas denominadas placas. Para obtener más información, consulte [Placas de la celda de flujo en la página 52](#).

## Descripción general del cartucho de reactivos

El cartucho de reactivos es un consumible de un solo uso con seguimiento de RFID y depósitos con cierre metálico precargados con reactivos de generación de grupos y de secuenciación.

Figura 4 Cartucho de reactivos



El cartucho de reactivos incluye un depósito designado para la carga de bibliotecas preparadas. Una vez iniciado el experimento, las bibliotecas se transfieren de forma automática del depósito a la celda de flujo. Varios depósitos se reservan para el lavado automático posterior al experimento. La solución de lavado se bombea desde el cartucho de tampones hasta los depósitos reservados a través del sistema y, posteriormente, hasta el contenedor de reactivos usados.

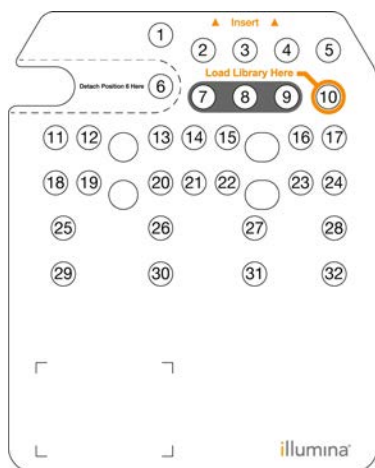


### ADVERTENCIA

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

## Depósitos reservados

Figura 5 Depósitos numerados



Posición	Descripción
7, 8 y 9	Reservados para cebadores personalizados opcionales
10	Carga de bibliotecas

Para obtener información sobre los cebadores personalizados, consulte la *Guía de cebadores personalizados de NextSeq* (n.º de documento 15057456).

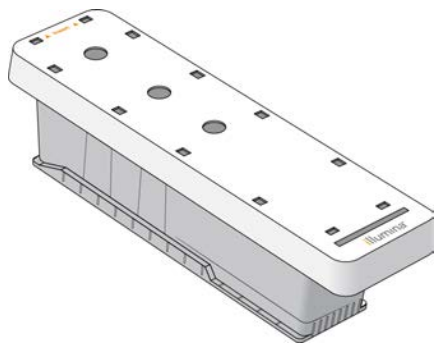
## Depósito retirable de la posición n.º 6

El cartucho de reactivos precargado incluye un reactivo de desnaturalización en la posición 6 que contiene formamida. Para garantizar un desecho seguro de cualquier reactivo no usado tras el experimento de secuenciación, se puede retirar el depósito en la posición seis. Para obtener más información, consulte *Retirada del depósito usado de la posición n.º 6* en la página 25.

## Descripción general del cartucho de tampones

El cartucho de tampones es un consumible de un solo uso que contiene tres depósitos precargados con tampones y una solución de lavado. El contenido del cartucho de tampones es suficiente para efectuar la secuenciación de una celda de flujo.

**Figura 6** Cartucho de tampones



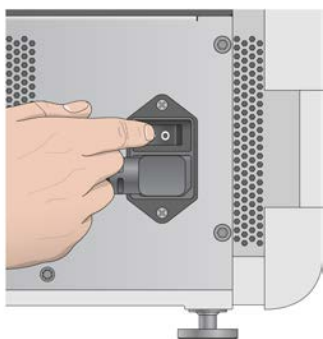
# Capítulo 2 Primeros pasos

Puesta en servicio del instrumento .....	10
Personalización de los ajustes del sistema .....	11
Personalización de los ajustes del experimento .....	12
Consumibles y equipos proporcionados por el usuario .....	13

## Puesta en servicio del instrumento

Coloque el interruptor de encendido principal en la posición I (On) (Encendido).

**Figura 7** Interruptor de encendido situado en la parte trasera del instrumento



- 1 Pulse el botón de encendido situado sobre el compartimento de reactivos. El botón de encendido enciende la alimentación del instrumento e inicia el ordenador y el software integrados en él.

**Figura 8** Botón de encendido situado en la parte delantera del instrumento



- 2 Espere hasta que el sistema operativo se haya cargado completamente. NextSeq Control Software (NCS) se carga e inicializa el sistema automáticamente. Una vez finalizada la inicialización, se abre la pantalla Home (Inicio).
- 3 Si su sistema se ha configurado para solicitar credenciales de inicio de sesión, espere a que el sistema se cargue y, a continuación, inicie sesión en el sistema operativo. De ser necesario, póngase en contacto con el administrador de las instalaciones para conocer el nombre de usuario y la contraseña.

## Personalización de los ajustes del sistema

El software de control incluye ajustes personalizables del sistema para las siguientes opciones. Para cambiar los ajustes de la configuración de red, consulte *Configuración de ajustes del sistema* en la página 44.

- ▶ Personalización de la identificación del instrumento (avatar y alias)
- ▶ Establecimiento del indicador de audio y opción de teclado
- ▶ Establecimiento de la opción de fórmulas personalizadas
- ▶ Establecimiento de la comprobación de actualizaciones de software del instrumento desde BaseSpace Sequence Hub
- ▶ Establecimiento de la opción de envío de datos de rendimiento del instrumento

## Personalización de avatar y alias del instrumento

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **System Customization** (Personalización del sistema).
- 3 Para asignar la imagen de avatar que desea para el instrumento, seleccione **Browse** (Examinar) y vaya a la imagen.
- 4 En el campo Nickname (Alias), introduzca el nombre de instrumento deseado.
- 5 Seleccione **Save** (Guardar) para guardar los ajustes y avanzar a la siguiente pantalla. La imagen y el nombre aparecen en la esquina superior izquierda de cada pantalla.

## Establecimiento del indicador de audio y opción de teclado

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **System Customization** (Personalización del sistema).
- 3 Seleccione la casilla de verificación **Use on-screen keyboard** (Usar teclado en pantalla) para activar el teclado en pantalla e introducir datos en el instrumento.
- 4 Seleccione la casilla de verificación **Play audio** (Reproducir audio) para activar los indicadores de audio en las siguientes situaciones.
  - ▶ Al inicializar el instrumento
  - ▶ Al iniciar un experimento
  - ▶ Cuando se produzcan determinados errores
  - ▶ Cuando sea necesaria la interacción del usuario
  - ▶ Cuando finalice un experimento
- 5 Seleccione **Save** (Guardar) para guardar los ajustes y avanzar a la siguiente pantalla.

## Establecimiento de la opción de fórmulas personalizadas

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **System Customization** (Personalización del sistema).
- 3 Seleccione la casilla de verificación **Enable Custom Recipes** (Habilitar fórmulas personalizadas) para habilitar la selección de una fórmula personalizada cuando se cargue un cartucho de reactivos. Para obtener más información, consulte *Fórmulas personalizadas y carpetas de fórmulas* en la página 41.
- 4 Seleccione **Save** (Guardar) para guardar los ajustes y avanzar a la siguiente pantalla.

## Establecimiento de la comprobación de actualizaciones de software del instrumento desde BaseSpace

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **System Customization** (Personalización del sistema).
- 3 Seleccione la casilla de verificación **Automatically check for new software updates on BaseSpace** (Buscar nuevas actualizaciones de software de BaseSpace automáticamente) para activar las búsquedas automáticas de las actualizaciones de BaseSpace Sequence Hub.  
La búsqueda automática de actualizaciones se realiza cada 24 horas. Cuando está disponible una actualización, aparece una notificación en los siguientes lugares.
  - ▶ En la pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento) en el icono de Software Update (Actualización del software).
  - ▶ En el botón Manage Instrument (Administrar instrumento) en la pantalla Home (Inicio).
- 4 Seleccione **Save** (Guardar) para guardar los ajustes y avanzar a la siguiente pantalla.

## Establecimiento de la opción de envío de datos de rendimiento del instrumento

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **System Customization** (Personalización del sistema).
- 3 Seleccione la opción **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar datos de rendimiento del instrumento a Illumina) para activar el servicio de supervisión Illumina Proactive. El nombre del ajuste en la interfaz de software puede diferir del nombre que figura en esta guía, en función de la versión del NCS que se esté usando.  
Con este ajuste activado, los datos del rendimiento del instrumento se envían a Illumina. Estos datos ayudan a Illumina a solucionar problemas de forma más sencilla y a detectar posibles fallos, lo que permite llevar a cabo tareas de mantenimiento proactivo y maximizar el tiempo de actividad del instrumento. Para obtener más información sobre las ventajas de este servicio, consulte la *Nota técnica de Illumina Proactive* (n.º de documento 1000000052503).  
Tenga en cuenta lo siguiente en relación con este servicio:
  - ▶ No envía datos de secuenciación.
  - ▶ Requiere que el instrumento esté conectado a una red con acceso a Internet.
  - ▶ Está activado de manera predeterminada. Para desactivar este servicio, desactive el ajuste **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar datos de rendimiento del instrumento a Illumina).
- 4 Seleccione **Save** (Guardar) para guardar los ajustes y avanzar a la siguiente pantalla.

## Personalización de los ajustes del experimento

El software de control incluye ajustes personalizables para establecer las preferencias de configuración del experimento y para la purga de reactivos no usados.

## Establecimiento de las opciones de configuración del experimento

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **System Customization** (Personalización del sistema).

- 3 Seleccione la casilla de verificación **Use Advanced Load Consumables** (Usar consumibles de carga avanzada) para habilitar la opción de cargar todos los consumibles del experimento en una sola pantalla.
- 4 Seleccione la casilla de verificación **Skip Pre-Run Check Confirmation** (Omitir confirmación de comprobación previa al experimento) para iniciar automáticamente la secuenciación después de que se lleve a cabo correctamente una comprobación automática.
- 5 Seleccione **Save** (Guardar) para guardar los ajustes y salir de la pantalla.

## Establecimiento de la opción de purga automática

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **System Customization** (Personalización del sistema).
- 3 Seleccione la casilla de verificación **Purge Consumables at End of Run** (Purgar consumibles al final del experimento) para purgar los reactivos no usados del cartucho de reactivos y llevarlos al contenedor de reactivos usados de forma automática después de cada experimento.



### NOTA

La purga automática de consumibles añade tiempo adicional al flujo de trabajo.

- 4 Seleccione **Save** (Guardar) para guardar los ajustes y salir de la pantalla.

## Consumibles y equipos proporcionados por el usuario

En NextSeq 500, se emplean los consumibles y equipos siguientes.

### Consumibles para secuenciación

Consumible	Proveedor	Finalidad
NaOH 1 N (hidróxido sódico)	Proveedor de laboratorio general	Desnaturalización de bibliotecas, dilución a 0,2 N
Paño humedecido en alcohol isopropilo al 70 % o en etanol al 70 %	VWR, n.º de catálogo 95041-714 (o equivalente) Proveedor de laboratorio general	Limpieza de la celda de flujo y fines generales
Toallita de laboratorio sin pelusa	VWR, n.º de catálogo 21905-026 (o equivalente)	Limpieza de la celda de flujo

### Consumibles para mantenimiento y solución de problemas

Consumible	Proveedor	Finalidad
NaOCl al 5 % (hipoclorito de sodio)	Sigma-Aldrich, n.º de catálogo 239305 (o equivalente de laboratorio)	Lavado del instrumento con el lavado manual posterior al experimento; diluido al 0,12 %
Tween 20	Sigma-Aldrich, n.º de catálogo P7949	Lavado del instrumento con las opciones de lavado manual; diluido al 0,05 %
Agua de laboratorio	Proveedor de laboratorio general	Lavado del instrumento (lavado manual)



Consumible	Proveedor	Finalidad
Metanol o alcohol isopropilo de grado reactivo o espectrofotométrico (99 %), botella de 100 ml	Proveedor de laboratorio general	Limpieza periódica de los componentes de la óptica y soporte para el cartucho de limpieza del objetivo.
Filtro de aire	Illumina, n.º de catálogo 20022240	Para instrumentos con un filtro de aire accesible desde el panel trasero. Limpieza del aire que el instrumento recibe para refrigerarse.

## Guías para el agua de laboratorio

Use siempre agua de laboratorio o agua desionizada para llevar a cabo los procedimientos del instrumento. No use nunca agua corriente. Use solamente los siguientes tipos de agua o equivalentes:

- ▶ Agua desionizada
- ▶ Illumina PW1
- ▶ Agua de 18 Megohmios (MΩ)
- ▶ Agua Milli-Q
- ▶ Agua Super-Q
- ▶ Agua de biología molecular

## Equipo

Elemento	Fuente	Finalidad
Congelador, entre -25 °C y -15 °C, sin hielo	Proveedor de laboratorio general	Almacenamiento del cartucho
Hielera	Proveedor de laboratorio general	Reserva de las bibliotecas
Refrigerador, entre 2 °C y 8 °C	Proveedor de laboratorio general	Almacenamiento de la celda de flujo

# Capítulo 3 Secuenciación

Introducción .....	15
Creación de un experimento con el software Local Run Manager .....	16
Creación de un experimento con NCS .....	16
Preparación del cartucho de reactivos .....	16
Preparación de la celda de flujo .....	17
Preparación de bibliotecas para la secuenciación .....	18
Configuración de un experimento de secuenciación .....	19
Supervisión del progreso del experimento .....	26
Lavado automático posterior al experimento .....	28

## Introducción

Para realizar un experimento de secuenciación en NextSeq 500, prepare un cartucho de reactivos y la celda de flujo. A continuación, siga las indicaciones del software para configurar e iniciar el experimento. La generación de grupos y la secuenciación se realizan de manera integrada en el instrumento. Tras el experimento, se inicia un lavado del instrumento de forma automática usando los componentes ya cargados en él.

## Generación de grupos

Durante la generación de grupos, las moléculas individuales de ADN se unen a la superficie de la celda de flujo y, a continuación, se amplifican para formar grupos.

## Secuenciación

Las imágenes de los grupos se adquieren mediante el uso de química de secuenciación de dos canales y combinaciones de filtro específicas para cada uno de los terminadores de cadena etiquetados con fluorescencia. Tras finalizar la adquisición de imágenes de una placa en la celda de flujo, se procede a la adquisición de imágenes de la placa siguiente. El proceso se repite para cada ciclo de secuenciación. Después del análisis de imágenes, el software ejecuta las llamadas de bases, el filtrado y la puntuación de calidad.

Supervise el progreso del experimento y las estadísticas en las siguientes ubicaciones.

- ▶ La interfaz de NCS
- ▶ BaseSpace Sequence Hub
- ▶ Local Run Manager
- ▶ Un ordenador conectado a la red mediante el uso del software Sequencing Analysis Viewer (SAV). Consulte *Sequencing Analysis Viewer* en la página 27.

## Análisis

A medida que el experimento avanza, el software de control transfiere de forma automática archivos de llamadas de bases (BCL) a BaseSpace Sequence Hub, Local Run Manager o a otra ubicación de salida especificada para el análisis secundario.

En función de la aplicación, hay varios métodos de análisis disponibles. Para obtener más información, consulte la Guía del centro de ayuda de *BaseSpace* o *Local Run Manager Software* (n.º de documento 100000002702).

## Duración del experimento de secuenciación

La duración del experimento de secuenciación depende del número de ciclos realizados. La duración máxima del experimento es la de un experimento "paired-end" de 150 ciclos por cada lectura ( $2 \times 150$ ) y, en el caso de las lecturas de índices, de hasta diez ciclos por cada una de ellas, que son dos.

Para obtener más información sobre las duraciones previstas y otras especificaciones del sistema, visite la [página de especificaciones de NextSeq 500](#) en el sitio web de Illumina.

## Número de ciclos de una lectura

En un experimento de secuenciación, el número de ciclos realizados en una lectura es un ciclo más que el número de ciclos analizados. Por ejemplo, un experimento "paired-end" de 150 ciclos realiza dos lecturas de 151 ciclos ( $2 \times 151$ ) para un total de 302 ciclos. Al final del experimento se habrán analizado  $2 \times 150$  ciclos. El ciclo adicional es necesario para los cálculos de fase de hebra retrasada y fase de hebra adelantada.

## Creación de un experimento con el software Local Run Manager

El proceso de configuración de los parámetros de experimentos y análisis en Local Run Manager varía dependiendo del módulo de flujo de trabajo de análisis que se use. Consulte la guía del módulo Local Run Manager para obtener instrucciones específicas sobre cómo crear un experimento.

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Edit Runs** (Editar experimentos).
- 2 Seleccione **Create Run** (Crear experimento) en el panel principal de Local Run Manager y seleccione un módulo de análisis.
- 3 Introduzca el nombre del experimento, las muestras del experimento y, si procede, importe los manifiestos.
- 4 Guarde el experimento y cierre la ventana del panel principal de Local Run Manager.

Para crear un experimento en NCS, sin el software Local Run Manager, use el modo de experimento manual. Consulte *Creación de un experimento con NCS* en la página 16 y *Modos de experimento* en la página 19.

## Creación de un experimento con NCS

Si crea un experimento con NCS (modo de experimento manual), se introducen los parámetros de experimento y análisis inmediatamente antes de la carga de la celda de flujo.

- 1 Revise los parámetros de experimento y análisis requeridos en *Introduzca los parámetros de experimento y análisis en NCS (Modo de experimento manual)* en la página 21.
- 2 Determine los parámetros de experimento y análisis para que no se produzca ningún retraso al iniciar su experimento de secuenciación.

## Preparación del cartucho de reactivos

- 1 Retire el cartucho de reactivos almacenado a una temperatura de entre  $-25^{\circ}\text{C}$  y  $-15^{\circ}\text{C}$ .
- 2 Introdúzcalo en un baño con agua a temperatura ambiente hasta que se descongele (aprox. 60 minutos). No sumerja el cartucho.

- 3 Golpéelo ligeramente sobre la mesa para sacar el agua de la base y, a continuación, seque la base.  
**[Método alternativo]** Descongele los reactivos durante la noche a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C. Los reactivos necesitan un mínimo de 18 horas para descongelarse. A esta temperatura, los reactivos permanecen estables hasta una semana.
- 4 Invierta el cartucho cinco veces para mezclar los reactivos.
- 5 Inspeccione las posiciones 29, 30, 31 y 32 para asegurarse de que los reactivos estén descongelados.
- 6 Golpéelo ligeramente sobre la mesa para reducir las burbujas de aire.



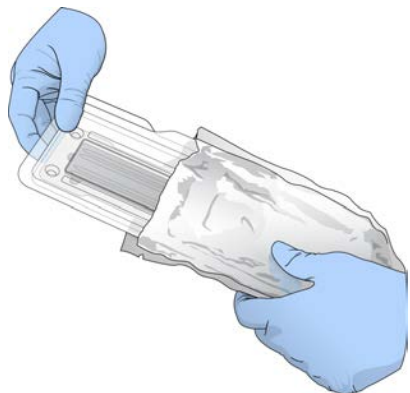
#### ADVERTENCIA

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

## Preparación de la celda de flujo

- 1 Retire un nuevo embalaje de celda de flujo de su almacenamiento a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.
- 2 Retire la celda de flujo del embalaje metálico.

Figura 9 Retirada del embalaje metálico



- 3 Deje el embalaje de la celda de flujo desenvuelto a temperatura ambiente durante 30 minutos.



#### NOTA

Si el embalaje metálico está intacto, la celda de flujo puede permanecer a temperatura ambiente hasta 12 horas. Evite el enfriamiento y el calentamiento repetidos de la celda de flujo.

- 4 Abra el estuche protector del embalaje de plástico transparente y retire la celda de flujo.

**Figura 10** Retirada del estuche protector del embalaje



- 5 Limpie la superficie de cristal de la celda de flujo con un paño sin pelusa humedecido en alcohol. Seque el cristal con una toallita de laboratorio sin pelusa.

## Preparación de bibliotecas para la secuenciación

La concentración de carga y el volumen de las bibliotecas varían en función de la versión de NCS que esté usando.

Versión de software de control	Volumen de bibliotecas	Concentración de bibliotecas
NCS v1.3 o versión posterior	1,3 ml	1,8 pM
NCS v1.2 o versión anterior	3 ml	3 pM

## Desnaturalización y dilución de bibliotecas

Desnaturalice y diluya sus bibliotecas en el siguiente volumen y concentración de carga.

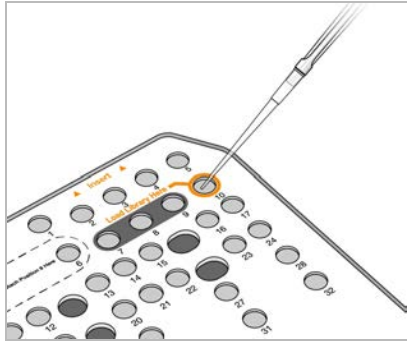
Tipo de kit	Volumen de carga	Concentración de carga
Rendimiento elevado	1,3 ml	1,8 pM
Rendimiento medio	1,3 ml	1,5 pM

En la práctica, la concentración de carga puede variar en función de los métodos de cuantificación y preparación de bibliotecas. Para obtener instrucciones, consulte la *Guía de bibliotecas de desnaturalización y dilución para NextSeq System (n.º de documento 15048776)*.

## Carga de bibliotecas en el cartucho de reactivos

- 1 Limpie el sello metálico que cubre el depósito n.º 10 marcado como **Load Library Here** (Cargar biblioteca aquí) con una toallita sin pelusa.
- 2 Perfore el sello con una punta de pipeta de 1 ml limpia.
- 3 Cargue 1,3 ml de bibliotecas de 1,8 pM preparadas en el depósito n.º 10 marcado como **Load Library Here** (Cargar biblioteca aquí). Evite tocar el sello metálico cuando dispense las bibliotecas.

**Figura 11** Carga de bibliotecas



## Configuración de un experimento de secuenciación

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Experiment** (Experimento).
- 2 En la pantalla Select Assay (Seleccionar ensayo), seleccione **Sequence** (Secuenciar).  
El comando Sequence (Secuenciar) abre la puerta del compartimento de adquisición de imágenes, suelta los consumibles del experimento anterior y abre el conjunto de pantallas de configuración del experimento. Suele producirse un breve retraso.

## Modos de experimento

Cuando configure un experimento de secuenciación, seleccione uno de los siguientes modos de experimento para determinar dónde se introduce información del experimento y cómo se analizan los datos.

Modo de experimento	Información de experimento	Análisis de datos*
Local Run Manager	Entre en Local Run Manager.	El software guarda los datos en la carpeta de resultados especificada para analizarlos de forma automática en Local Run Manager.
Manual	Entre en NCS.	El software guarda los datos en una carpeta de resultados especificada para su posterior análisis fuera del instrumento.

\* Con fines analíticos, BaseSpace Sequence Hub puede asociarse con cualquiera de los dos modos de experimento. Cuando el modo de experimento es Local Run Manager y BaseSpace Sequence Hub está configurado, ambas aplicaciones analizan los datos.

Local Run Manager es el modo de experimento predeterminado y proporciona el flujo de trabajo optimizado. Cree y guarde los experimentos en Local Run Manager. A continuación, se envía la información al software de control, donde selecciona un experimento y continúa con la configuración del experimento. Una vez que la secuenciación haya finalizado, Local Run Manager realiza automáticamente el análisis de los datos. No se requieren hojas de muestras ni aplicaciones de análisis independientes.



### NOTA

Local Run Manager no es una función del software de control. Se trata de un software integrado para registrar las muestras para secuenciar, especificar los parámetros del experimento y analizar los datos.

## BaseSpace Sequence Hub (Opcional)

Cuando configure un experimento de secuenciación, puede seleccionar una de las siguientes opciones de BaseSpace Sequence Hub.

Opción	Descripción y requisitos
<b>Run Monitoring and Storage (Almacenamiento y supervisión del experimento)</b>	Envía archivos InterOp, archivos de registro y datos del experimento a BaseSpace Sequence Hub para su análisis y supervisión remotos. Hace falta una cuenta de BaseSpace Sequence Hub, una conexión a Internet y una hoja de muestras.
<b>Run Monitoring Only (Solo supervisión del experimento)</b>	Envía archivos InterOp y de registro a BaseSpace Sequence Hub para la supervisión remota del experimento. Esta opción es la predeterminada. Requiere una cuenta de BaseSpace Sequence Hub y conexión a Internet.

## Selección del Modo de experimento y BaseSpace Sequence Hub

- En la pantalla Run Setup (Configuración del experimento), seleccione uno de los siguientes modos de experimento.
  - ▶ Local Run Manager
  - ▶ Manual
- [Opcional]** Seleccione **Use BaseSpace Sequence Hub Setting** (Usar ajustes de BaseSpace Sequence Hub) y seleccione uno de los siguientes.
  - ▶ Run Monitoring and Storage (Almacenamiento y supervisión del experimento)
  - ▶ Run Monitoring Only (Solo supervisión del experimento)

Introduzca su nombre de usuario y contraseña de BaseSpace Sequence Hub.

Si se le solicita, seleccione un grupo de trabajo al que cargar datos del experimento. Se le solicitará solo si pertenece a varios grupos de trabajo.
- Seleccione **Next** (Siguiente).

## Seleccione Run (Experimento) (Modo de experimento de Local Run Manager)

- Seleccione el nombre de un experimento en la lista de experimentos disponibles. Use las flechas arriba y abajo para desplazarse por la lista o introduzca un nombre de experimento en el campo Search (Buscar).
- Confirme los parámetros del experimento.
  - ▶ **Run Name (Nombre del experimento):** nombre del experimento asignado en Local Run Manager.
  - ▶ **Library ID (ID de biblioteca):** nombre de las bibliotecas agrupadas asignado en Local Run Manager.
  - ▶ **Recipe (Fórmula):** Nombre de la fórmula, bien **NextSeq High** (Elevado) o bien **NextSeq Mid** (Medio) en función del cartucho de reactivos usado en el experimento.
  - ▶ **Read Type (Tipo de lectura):** lectura única o “paired-end”.
  - ▶ **Read Length (Longitud de lectura):** número de ciclos de cada lectura.
  - ▶ **[Opcional]** Cebadores personalizados, si corresponde.
- [Opcional]** Seleccione el icono **Edit** (Editar) para cambiar los parámetros del experimento. Cuando termine, seleccione **Save** (Guardar).
  - ▶ **Run parameters (Parámetros del experimento):** cambie el número de lecturas o el número de ciclos por lectura.

- ▶ **Custom primers (Cebadores personalizados):** cambie la configuración de los cebadores personalizados. Para obtener más información, consulte la *Guía de cebadores personalizados de NextSeq (n.º de documento 15057456)*.
- ▶ **Purge consumables for this run (Purgar consumibles para este experimento):** cambie el ajuste para purgar los consumibles de forma automática tras el experimento actual.

4 Seleccione **Next** (Siguiente).

## Introduzca los parámetros de experimento y análisis en NCS (Modo de experimento manual)

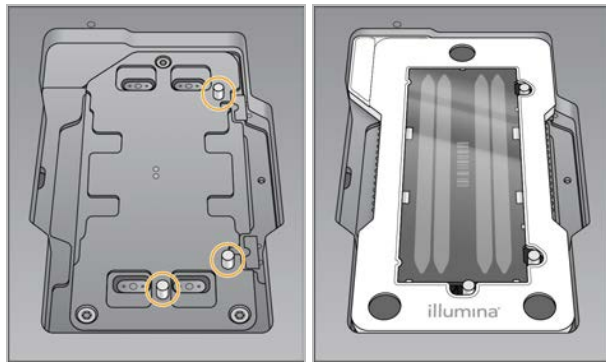
- 1 Introduzca el nombre de experimento que desee.
- 2 **[Opcional]** Introduzca el ID de biblioteca que desee.
- 3 En la lista desplegable Recipe (Fórmula), seleccione una fórmula. Solo se muestran las fórmulas compatibles.
- 4 Seleccione un tipo de lectura, **Single Read** (Lectura individual) o **Paired-End**.
- 5 Introduzca el número de ciclos de cada lectura en el experimento de secuenciación.
  - ▶ **Read 1 (Lectura 1):** Introduzca un valor de, como máximo, 151 ciclos.
  - ▶ **Read 2 (Lectura 2):** Introduzca un valor de, como máximo, 151 ciclos. Este valor suele coincidir con el número de ciclos de la Lectura 1.
  - ▶ **Index 1 (Índice 1):** introduzca el número de ciclos necesario para el cebador del Índice 1 (i7).
  - ▶ **Index 2 (Índice 2):** introduzca el número de ciclos necesario para el cebador del Índice 2 (i5).El software de control confirma las entradas con los criterios siguientes:
  - ▶ El número total de ciclos no supera el máximo número permitido de ciclos.
  - ▶ Los ciclos para la Lectura 1 son superiores a los cinco ciclos usados para la generación de plantillas.
  - ▶ Los ciclos de la lectura del índice no superan los ciclos de la Lectura 1 y la Lectura 2.
- 6 **[Opcional]** Si usa cebadores personalizados, seleccione la casilla de verificación para los cebadores usados. Para obtener más información, consulte la *Guía de cebadores personalizados de NextSeq (n.º de documento 15057456)*.
  - ▶ **Read 1 (Lectura 1):** cebador personalizado para la Lectura 1.
  - ▶ **Read 2 (Lectura 2):** cebador personalizado para la Lectura 2.
  - ▶ **Index 1 (Índice 1):** cebador personalizado para el Índice 1.
  - ▶ **Index 2 (Índice 2):** cebador personalizado para el Índice 2.
- 7 Establezca la ubicación de la carpeta de resultados del experimento actual. Seleccione **Browse** (Examinar) para ir a una ubicación de red.  
Para obtener información acerca de los requisitos de la carpeta de resultados, consulte *Configuración de la ubicación de la carpeta de resultados en la página 46*.
- 8 Seleccione **Browse** (Examinar) para ir hasta la ubicación de una hoja de muestras.  
Los sistemas configurados en modo manual con almacenamiento y supervisión del experimento en BaseSpace Sequence Hub requieren la especificación de una hoja de muestras.
- 9 Seleccione **Purge consumables for this run** (Purgar consumibles para este experimento).  
El ajuste purga los consumibles automáticamente después del experimento actual.
- 10 Seleccione **Next** (Siguiente).
- 11 **[Opcional]** Seleccione el icono Edit (Editar) para cambiar los parámetros del experimento.
- 12 Seleccione **Next** (Siguiente).



## Carga de la celda de flujo

- 1 Retire la celda de flujo usada de un experimento anterior.
- 2 Alinee la celda de flujo sobre los pasadores de alineación y colóquela en la platina.

**Figura 12** Carga de la celda de flujo



- 3 Seleccione **Load** (Cargar).  
La puerta se cierra de forma automática, el ID de la celda de flujo aparece en pantalla y se comprueban los sensores.
- 4 Seleccione **Next** (Siguiente).

## Vaciado del contenedor de reactivos usados

- 1 Retire el contenedor de reactivos usados y deseche el contenido de conformidad con las normativas aplicables.

**Figura 13** Retirada del contenedor de reactivos usados



### NOTA

Cuando retire el contenedor, coloque la otra mano debajo para sujetarlo.

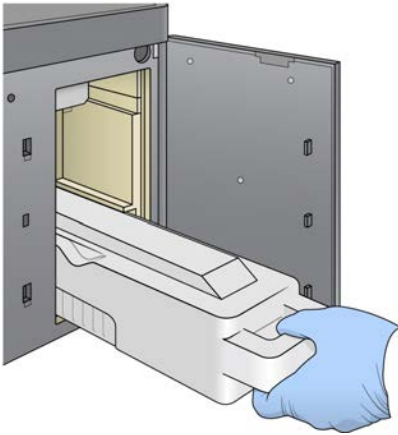


### ADVERTENCIA

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

- 2 Deslice el contenedor de reactivos usados vacío dentro del compartimento de tampones hasta que se detenga. Oirá un clic que indica que el contenedor está colocado.

Figura 14 Carga del contenedor de reactivos usados vacío



## Carga del cartucho de tampones

- 1 Retire el cartucho de tampones usado del compartimento superior.
- 2 Deslice un nuevo cartucho de tampones dentro del compartimento de tampones hasta que se detenga. Oirá un clic que indica que el cartucho está colocado; el ID del cartucho de tampones aparece en la pantalla y se comprueba el sensor.

Figura 15 Carga del cartucho de tampones



- 3 Cierre la puerta del compartimento de tampones y seleccione **Next** (Siguiente).

## Carga del cartucho de reactivos

- 1 Retire el cartucho de reactivos usado del compartimento de reactivos. Deseche el contenido no usado de conformidad con las normativas aplicables.



### ADVERTENCIA

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

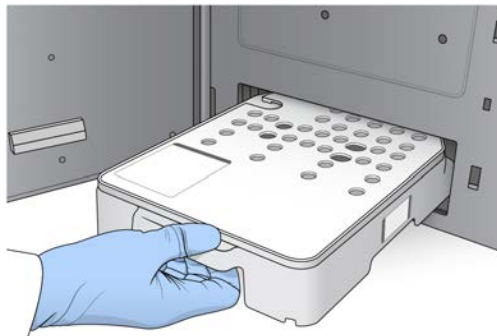


### NOTA

Para garantizar un desecho seguro del reactivo no usado, el depósito de la posición 6 es retirable. Para obtener más información, consulte *Retirada del depósito usado de la posición n.º 6* en la página 25.

- 2 Deslice el cartucho de reactivos dentro del compartimento de reactivos hasta que el cartucho se detenga y, a continuación, cierre la puerta del compartimento de reactivos.

Figura 16 Carga del cartucho de reactivos

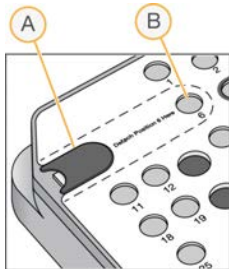


- 3 Seleccione **Load** (Cargar).  
El software desplaza el cartucho hasta su sitio de forma automática (tarda unos 30 segundos), el ID del cartucho de reactivos aparece en la pantalla y se comprueban los sensores.
- 4 Seleccione **Next** (Siguiendo).

## Retirada del depósito usado de la posición n.º 6

- 1 Tras extraer el cartucho de reactivos **usado** del instrumento, retire la cubierta protectora de goma que hay sobre la ranura que se encuentra junto a la posición n.º 6.

**Figura 17** Posición n.º 6 retirable



- A Cubierta protectora de goma
- B Posición n.º 6

- 2 Presione la pestaña de plástico transparente y empuje hacia la izquierda para extraer el depósito.
- 3 Deseche el depósito de conformidad con las normativas aplicables.

## Revisión de la comprobación automática

El software ejecuta una comprobación automática del sistema. Durante la comprobación, aparecen en la pantalla los siguientes indicadores:

- ▶ **Marca de verificación gris** : todavía no se ha efectuado la comprobación.
- ▶ **Icono de progreso** : la comprobación está en curso.
- ▶ **Marca de verificación verde** : se ha superado la comprobación.
- ▶ **Cruz roja** : no se ha superado la comprobación. Todos los elementos que no la superen, precisan una acción antes de continuar. Consulte [Solución de errores de la comprobación automática](#) en la página 37.

Para detener una comprobación automática en curso, seleccione el icono en la esquina inferior derecha. Para reiniciar la comprobación, seleccione el icono . La comprobación reanuda la primera comprobación incompleta o con error.

Para ver los resultados de cada comprobación dentro de una categoría, seleccione el icono para ampliar la categoría.



### NOTA

Cuando lleva a cabo el primer experimento de secuenciación con NCS v4.0 o una versión posterior, es normal que el registro de la celda de flujo dure más de 15 minutos durante la comprobación automatizada del sistema.

## Inicio del experimento

Una vez finalizada la comprobación automática, seleccione **Start** (Iniciar). Empieza el experimento de secuenciación.

Para configurar el sistema de modo que el experimento se inicie de forma automática después de comprobar que todo es correcto, consulte *Establecimiento de las opciones de configuración del experimento* en la página 12.

## Supervisión del progreso del experimento

- 1 Supervise el progreso del experimento, las intensidades y las puntuaciones de calidad mientras los datos de medición aparecen en la pantalla.

**Figura 18** Progreso y datos de medición del experimento de secuenciación



- A **Run progress (Progreso del experimento)**: muestra el paso actual y el número de ciclos completados para cada lectura. La barra de progreso no es proporcional a la velocidad del experimento de cada paso. Use el tiempo restante de la esquina superior derecha para determinar la duración real.
- B **Q-Score (Puntuación Q)**: muestra la distribución de las puntuaciones de calidad (puntuaciones Q). Consulte *Puntuación de calidad* en la página 51.
- C **Intensity (Intensidad)**: muestra el valor de las intensidades de grupos del percentil 90 para cada placa. Los colores del diagrama indican cada base: rojo es A, verde es C, azul es G y negro es T. Los colores coinciden con los indicadores de las bases usados en el software de análisis de secuenciación (SAV, Sequencing Analysis Viewer).
- D **Cluster Density (K/mm<sup>2</sup>) (Densidad de grupos [K/mm<sup>2</sup>])**: muestra el número de grupos detectado para el experimento.
- E **Clusters Passing Filter (%) (Grupos que superan el filtro [%])**: muestra el porcentaje de grupos que superan el filtro. Consulte *Grupos que superan el filtro* en la página 50.
- F **Estimated Yield (Gb) (Rendimiento estimado [Gb])**: muestra el número proyectado de bases para el experimento.



### NOTA

Tras seleccionar Home (Inicio), no es posible volver a ver los criterios de medición del experimento. No obstante, puede acceder a los criterios de medición del experimento en BaseSpace Sequence Hub o desde un ordenador independiente mediante el uso de Sequencing Analysis Viewer (SAV).













## Ciclos de criterios de medición del experimento

Los criterios de medición del experimento aparecen en distintos puntos de un experimento.

- ▶ Durante los pasos de generación de grupos, no se mostrarán los criterios de medición.
- ▶ Los primeros cinco ciclos se reservan para generación de plantillas.
- ▶ Los criterios de medición del experimento aparecen tras el ciclo 25, incluida la densidad de grupos, los grupos que superan el filtro, el rendimiento y las puntuaciones de calidad.

## Transferencia de datos

En función de la configuración de análisis seleccionada, durante el experimento aparece un icono en la pantalla para indicar el estado de la transferencia de datos.

Estado	Local Run Manager	Carpeta de resultados	BaseSpace de Illumina
Conectado			
Conectado y transfiriendo datos			
Desconectado			
Desactivado			

Si la transferencia de datos se interrumpe durante el experimento, los datos se almacenan temporalmente en el ordenador del instrumento. Al restablecer la conexión, la transferencia de datos se reanuda de manera automática. Si la conexión no se restablece antes de finalizar el experimento, se deben eliminar manualmente los datos del ordenador del instrumento para que pueda empezar el siguiente experimento.

## Servicio de copia universal

El paquete de software de NextSeq System incluye un servicio de copia universal. RTA v2 solicita al servicio que copie los archivos desde una ubicación de origen hasta una ubicación de destino y el servicio procesa las solicitudes de copia en el orden recibido. Si se produce una excepción, el archivo se vuelve a poner en la cola de copia según el número de archivos que haya en la cola de copia.

## Sequencing Analysis Viewer

El software Sequencing Analysis Viewer muestra los criterios de medición generados durante el experimento. Estos datos aparecen en forma de diagramas, gráficos y tablas según los datos generados por RTA y escritos en los archivos InterOp. Los datos se actualizan conforme avanza el experimento. Seleccione **Refresh** (Actualizar) en cualquier momento durante el experimento para ver los datos actualizados. Para obtener más información, consulte la *Guía del usuario de Sequencing Analysis Viewer (n.º de referencia 15020619)*.

Sequencing Analysis Viewer está incluido en el software instalado en el ordenador del instrumento. También puede instalar Sequencing Analysis Viewer en otro ordenador conectado a la misma red que el instrumento para supervisar de forma remota los criterios de medición del experimento.

## Lavado automático posterior al experimento

Al finalizar el experimento de secuenciación, el software inicia un lavado automático posterior al experimento. El lavado posterior al experimento usa una solución de lavado suministrada en el cartucho de tampones y NaOCl suministrado en el cartucho de reactivos.

El lavado automático posterior al experimento dura aproximadamente 90 minutos. Cuando el lavado finaliza, se activa el botón **Home** (Inicio). Los resultados de secuenciación permanecen visibles en la pantalla durante el lavado.

## Después del lavado

Después del lavado, los dispensadores permanecen en la posición bajada para evitar que entre aire en el sistema. Deje los cartuchos en su lugar hasta el próximo experimento.

# Capítulo 4 Mantenimiento

Introducción .....	29
Realización de un lavado manual .....	29
Sustitución del filtro de aire .....	32
Actualizaciones de software .....	33
Apagado del instrumento .....	35

## Introducción

Los procedimientos de mantenimiento incluyen los lavados manuales del instrumento, la sustitución del filtro de aire y las actualizaciones del software del sistema si están disponibles.

- ▶ **Lavados del instrumento:** un lavado automático posterior al experimento después de cada experimento de secuenciación mantiene el rendimiento del instrumento. No obstante, es preciso realizar un lavado manual periódicamente en determinadas condiciones. Consulte *Realización de un lavado manual en la página 29*.
- ▶ **Actualizaciones de software:** cuando esté disponible una versión actualizada del software del sistema, puede instalarla automáticamente mediante uno de los dos métodos siguientes.
  - ▶ A través de una conexión a BaseSpace Sequence Hub
  - ▶ Manualmente después de descargar el instalador del sitio web de Illumina. Consulte *Actualizaciones de software en la página 33*.
- ▶ **Sustitución del filtro de aire:** si el instrumento incluye un filtro de aire accesible desde el panel trasero, su sustitución asegurará un flujo de aire correcto a través del instrumento.

## Mantenimiento preventivo

Illumina recomienda programar un servicio de mantenimiento preventivo cada año. Si no dispone de contrato de servicios, póngase en contacto con el comercial de su región o con el servicio de asistencia técnica de Illumina para acordar un servicio de mantenimiento preventivo facturable.

## Realización de un lavado manual

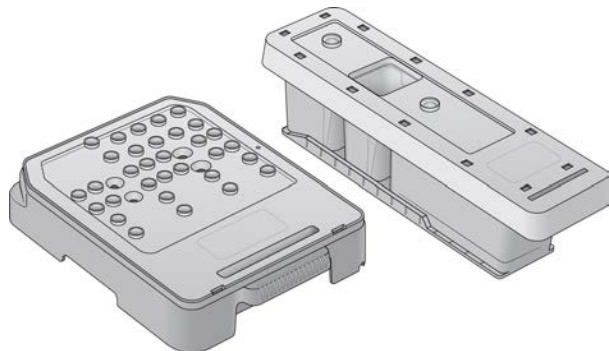
Los lavados manuales se inician en la pantalla Home (Inicio). Entre las opciones de lavado, están el lavado rápido y el lavado manual posterior al experimento.

Tipos de lavado	Descripción
<b>Lavado rápido</b> <b>Duración: 20 minutos</b>	Lava el sistema con una solución de lavado proporcionada por el usuario de agua de laboratorio y Tween 20 (cartucho de lavado de tampones). Es necesario cada 14 días que el instrumento permanezca inactivo o después de un apagado.
<b>Lavado manual posterior al experimento</b> <b>Duración: 90 minutos</b>	Lava el sistema con una solución de lavado proporcionada por el usuario de agua de laboratorio y Tween 20 (cartucho de lavado de tampones) e hipoclorito de sodio al 0,12 % (cartucho de lavado de reactivos). Necesario en caso de no haber llevado a cabo un lavado automático posterior al experimento.

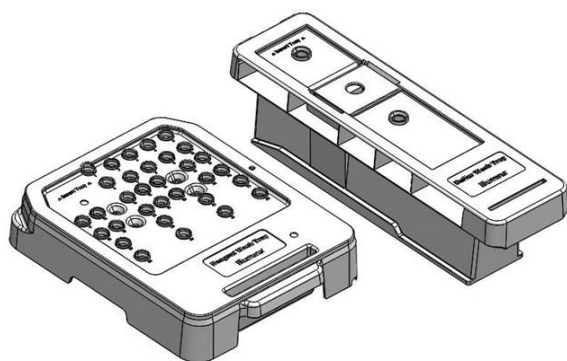
Para llevar a cabo un lavado manual, se debe usar el cartucho de lavado de reactivos y el cartucho de lavado de tampones que vienen con el instrumento, así como una celda de flujo usada. Una celda de flujo usada se puede usar hasta 20 veces para los lavados del instrumento.



**Figura 19** Cartucho de lavado de reactivos y cartucho de lavado de tampones de estilo original.



**Figura 20** Cartucho de lavado de reactivos y cartucho de lavado de tampones de estilo nuevo.



## Preparación para un lavado manual posterior al experimento

Consumibles proporcionados por el usuario	Volumen y descripción
<ul style="list-style-type: none"> <li>• NaOCl</li> </ul>	1 ml, diluido al 0,12 % Se carga en el cartucho de lavado de reactivos (en la posición n.º 28).
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tween 20 al 100 %</li> <li>• Agua de laboratorio</li> </ul>	Se usa para preparar una solución de lavado Tween 20 de 125 ml al 0,05 % Se carga en el cartucho de lavado de tampones (en el depósito central).

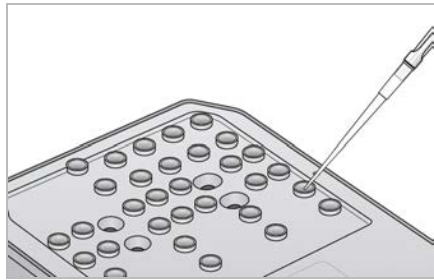


### NOTA

Use siempre una dilución de NaOCl nueva preparada en las últimas **24 horas**. Si prepara un volumen superior a 1 ml, almacene la dilución sobrante a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C para su uso en las próximas 24 horas. De lo contrario, deseche la dilución de NaOCl sobrante.

- 1 Combine los siguientes volúmenes en un tubo de microcentrifugación para conseguir 1 ml de NaOCl al 0,12 %:
  - ▶ NaOCl al 5 % (24 µl)
  - ▶ Agua de laboratorio (976 µl)
- 2 Invierta el tubo para mezclar.
- 3 Añada 1 ml de NaOCl al 0,12 % al cartucho de lavado de reactivos. El depósito correcto es el equivalente a la posición n.º **28** en el cartucho precargado.

Figura 21 Carga de NaOCl



- 4 Combine los siguientes volúmenes para que dé como resultado una solución de lavado de Tween 20 al 0,05 %:
  - Cartucho de lavado de tampones de estilo original
    - ▶ Tween 20 al 100 % (62 µl)
    - ▶ Agua de laboratorio (125 ml)
    - ▶ Añada 125 ml de solución de lavado al depósito central del cartucho de lavado de tampones.
  - Cartucho de lavado de tampones de estilo nuevo
    - ▶ Tween 20 al 100 % (75 µl)
    - ▶ Agua de laboratorio (150 ml)
    - ▶ Añada 150 ml de solución de lavado al depósito central del cartucho de lavado de tampones.
- 5 Seleccione **Perform Wash** (Realizar lavado) y, a continuación, **Manual Post-Run Wash** (Lavado manual posterior al experimento).

## Preparación para un lavado rápido

Consumibles proporcionados por el usuario	Volumen y descripción
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tween 20 al 100 %</li> <li>• Agua de laboratorio</li> </ul>	Se usa para preparar una solución de lavado de Tween 20 de 40 ml al 0,05 %. Se carga en el cartucho de lavado de tampones (en el depósito central).

- 1 Combine los siguientes volúmenes para que dé como resultado una solución de lavado de Tween 20 al 0,05 %:
  - ▶ Tween 20 al 100 % (20 µl)
  - ▶ Agua de laboratorio (40 ml)
- 2 Añada 40 ml de solución de lavado al depósito central del cartucho de lavado de tampones.
- 3 Seleccione **Perform Wash** (Realizar lavado) y, a continuación, **Quick Wash** (Lavado rápido).

## Carga de una celda de flujo usada y de los cartuchos de lavado

- 1 Si no hay ninguna celda de flujo usada, cargue una. Seleccione **Load** (Cargar) y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente).

- 2 Retire el contenedor de reactivos usados y deseche el contenido de conformidad con las normativas aplicables.



#### ADVERTENCIA

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

- 3 Deslice el contenedor de reactivos usados vacío dentro del compartimento de tampones hasta que se detenga.
- 4 Retire el cartucho de tampones usados del experimento anterior si todavía no lo ha hecho.
- 5 Cargue el cartucho de lavado de tampones que contiene la solución de lavado.
- 6 Retire el cartucho de reactivos usado del experimento anterior si todavía no lo ha hecho.
- 7 Cargue el cartucho de lavado de reactivos.
- 8 Seleccione **Next** (Siguiendo). La comprobación previa al lavado comienza de forma automática.

## Inicio del lavado

- 1 Seleccione **Start** (Iniciar).
- 2 Una vez finalizado el lavado, seleccione **Home** (Inicio).

## Después del lavado

Después del lavado, los dispensadores permanecen en la posición bajada para evitar que entre aire en el sistema. Deje los cartuchos en su lugar hasta el próximo experimento.

## Sustitución del filtro de aire

Los nuevos sistemas vienen con tres filtros de aire de repuesto. Estos deben ser almacenados y usados cuando se recibe un aviso del instrumento para cambiar el filtro.

En los instrumentos que incluyen un filtro de aire accesible desde el panel trasero, dicho filtro garantiza el flujo de aire a través del instrumento. El software muestra una notificación para cambiar el filtro de aire cada 90 días. Cuando se le solicite, seleccione **Remind in 1 day** (Recordarme en 1 día) o bien siga el procedimiento que se describe a continuación y seleccione **Filter Changed** (Filtro cambiado). Tras la selección de la opción **Filter Changed** (Filtro cambiado), la cuenta regresiva de 90 días se restablece.

- 1 Retire el filtro de aire nuevo del embalaje y anote la fecha de instalación en el marco del filtro.
- 2 En la parte trasera del instrumento, presione sobre la parte superior de la bandeja del filtro para liberar la bandeja.
- 3 Sujete la parte superior de la bandeja del filtro y tire hacia arriba para levantar la bandeja por completo y extraerla del instrumento.
- 4 Retire y deseche el filtro de aire antiguo.
- 5 Inserte el nuevo filtro de aire en la bandeja.

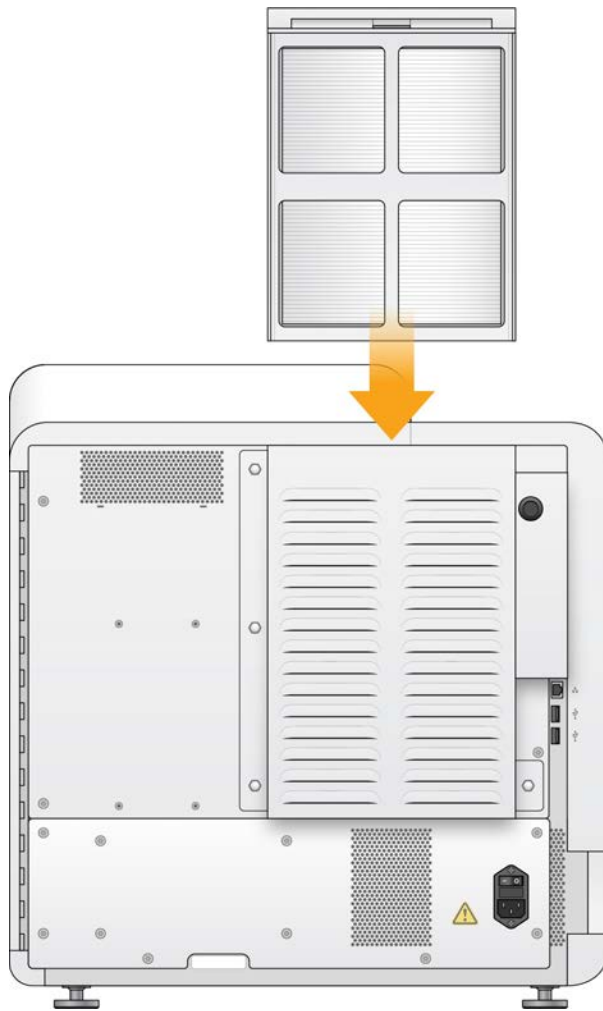


**NOTA**

El filtro de aire no funcionará correctamente si se coloca del revés. Asegúrese de que introduce el filtro de aire en la bandeja de forma que pueda ver la flecha hacia arriba de color verde y que no pueda ver la etiqueta de advertencia. La flecha debe apuntar hacia el asa de la bandeja del filtro.

- 6 Deslice la bandeja del filtro para introducirla en el instrumento. Presione sobre la parte superior de la bandeja del filtro hasta que se oiga un chasquido que indique que se ha colocado en su posición.

**Figura 22** Inserción del filtro de aire




## Actualizaciones de software

Las actualizaciones de software se suministran en un paquete llamado System Suite, que incluye el software siguiente:

- ▶ NextSeq Control Software (NCS)
- ▶ Fórmulas de NextSeq
- ▶ Software Local Run Manager
- ▶ RTA2

- ▶ Software de servicio de NextSeq (NSS)
- ▶ Servicio de copia universal
- ▶ Controlador de acceso directo a la memoria (DMA, Direct Memory Access)

Puede instalar las actualizaciones de software de forma automática con una conexión a Internet o de forma manual desde una ubicación de red o USB.

- ▶ **Actualizaciones automáticas:** si el instrumento está conectado a una red con acceso a Internet, aparecerá un icono de alerta  en el botón Manage Instrument (Administrar instrumento) de la pantalla Home (Inicio) cuando haya una actualización de software disponible.
- ▶ **Actualizaciones manuales:** descargue el instalador de System Suite de la [página de asistencia de NextSeq 500](#) en el sitio web de Illumina. Si piensa realizar una actualización manual, asegúrese de finalizarla antes de preparar las muestras y consumibles para un experimento de secuenciación.

## Actualización automática de software

- 1 Seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **Software Update** (Actualización de software).
- 3 Seleccione **Install the update already downloaded from BaseSpace** (Instalar la actualización descargada de BaseSpace).
- 4 Seleccione **Update** (Actualizar) para iniciar la actualización. Se abre un cuadro de diálogo para confirmar el comando.
- 5 Siga los mensajes del asistente de instalación:
  - a Acepte el acuerdo de licencia.
  - b Revise las notas de la versión.
  - c Revise la lista de software incluido en la actualización.

Al finalizar la actualización, el software de control se reinicia automáticamente.



### NOTA

Si se incluye una actualización de firmware, es necesario efectuar un reinicio automático del sistema después de que el firmware se haya actualizado.

## Actualización manual de software

- 1 Descargue el instalador de System Suite del sitio web de Illumina y guárdelo en una ubicación de red. De manera alternativa, copie el archivo de instalación del software en una unidad USB portátil.
- 2 Seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 3 Seleccione **Software Update** (Actualización de software).
- 4 Seleccione **Manually install the update from the following location** (Instalar manualmente la actualización desde la siguiente ubicación).
- 5 Seleccione **Browse** (Examinar) para ir a la ubicación del archivo de instalación del software y, a continuación, seleccione **Update** (Actualizar).

- 6 Siga los mensajes del asistente de instalación:
  - a Acepte el acuerdo de licencia.
  - b Revise las notas de la versión.
  - c Revise la lista de software incluido en la actualización.

Al finalizar la actualización, el software de control se reinicia automáticamente.



#### **NOTA**

Si se incluye una actualización de firmware, es necesario efectuar un reinicio automático del sistema después de que el firmware se haya actualizado.

## **Apagado del instrumento**

- 1 Seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **Shutdown Options** (Opciones de apagado).
- 3 Seleccione **Shutdown** (Apagar).

El comando Shutdown (Apagar) cierra el software de forma segura y apaga la alimentación del instrumento. Espere al menos 60 segundos antes de volver a encender el instrumento.



#### **PRECAUCIÓN**

**No** cambie la posición del instrumento. Si lo mueve de forma incorrecta, la alineación óptica podría verse afectada y comprometer la integridad de los datos. Si debe cambiar la posición del instrumento, póngase en contacto con su representante de Illumina.

# Apéndice A Resolución de problemas

Introducción .....	36
Archivos de solución de problemas .....	36
Solución de errores de la comprobación automática .....	37
Contenedor de reactivos usados lleno .....	38
Flujo de trabajo de la rehibridación .....	39
Fórmulas personalizadas y carpetas de fórmulas .....	41
Comprobación del sistema .....	41
Mensaje de error de RAID .....	43
Error de almacenamiento en red .....	44
Configuración de ajustes del sistema .....	44

## Introducción

Para cuestiones técnicas, visite las páginas de asistencia de NextSeq 500 en el sitio web de Illumina. Las páginas de asistencia proporcionan acceso a la documentación, las descargas y las preguntas frecuentes. Inicie sesión en su cuenta de MyIllumina para acceder a los boletines de asistencia.

Si tiene problemas con el rendimiento o la calidad de los experimentos, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina. Consulte *Asistencia técnica en la página 60*.

Le recomendamos compartir un enlace con el resumen del experimento en BaseSpace Sequence Hub con el servicio de asistencia técnica de Illumina para facilitar la solución de problemas. También puede ayudar a la solución de problemas cuando el servicio de supervisión Illumina Proactive está activo. Para obtener más información sobre el servicio, consulte *Establecimiento de la opción de envío de datos de rendimiento del instrumento en la página 12*.

## Archivos de solución de problemas

Es posible que el representante del servicio de asistencia técnica de Illumina le solicite que proporcione copias de archivos específicos del experimento o de la lectura para solucionar problemas. Normalmente, se usan los archivos siguientes para solucionar problemas. Los archivos se encuentran en carpetas específicas del experimento de la carpeta de resultados.

Archivo clave	Subcarpeta	Descripción
Archivo de información del experimento (RunInfo.xml)	<Nombre de la carpeta de experimento>	Contiene la siguiente información: <ul style="list-style-type: none"><li>• Nombre del experimento</li><li>• Número de ciclos del experimento</li><li>• Número de ciclos de cada lectura</li><li>• Si la lectura es una lectura indexada</li><li>• Número de sectores y placas de la celda de flujo</li></ul>
Archivo de parámetros del experimento (RunParameters.xml)	<Nombre de la carpeta de experimento>	Contiene información sobre los parámetros del experimento y los componentes del experimento. La información incluye el RFID, el número de serie, el número de producto y la fecha de caducidad.
Archivo de configuración de RTA (RTAConfiguration.xml)	Data\Intensities	Contiene los parámetros de configuración de RTA para el experimento. El archivo RTAConfiguration.xml se crea al inicio del experimento.

Archivo clave	Subcarpeta	Descripción
Archivos InterOp (*.bin)	InterOp	Archivos binarios de informes usados por Sequencing Analysis Viewer. Los archivos InterOp se actualizan durante el experimento.
Archivos de registro	Logs (Registros)	Los archivos de registro describen cada paso llevado a cabo por el instrumento en cada ciclo y enumeran las versiones de software y firmware usadas con el experimento. El archivo llamado [NombreDelInstrumento]_CurrentHardware.csv muestra los números de serie de los componentes del instrumento.
Archivos de registro de errores (*ErrorLog*.txt)	RTA Logs (Registros de RTA)	Registro de errores de RTA. Los archivos de registro de errores se actualizan siempre que se produce un error.
Archivos de registro global (*GlobalLog*.tsv)	RTA Logs (Registros de RTA)	Registro de todos los eventos de RTA. Los archivos de registro global se actualizan durante el experimento.
Archivos de registro de carril (*LaneLog*.txt)	RTA Logs (Registros de RTA)	Registro de eventos de procesamiento de RTA. Los archivos de registro de carril se actualizan durante el experimento.

## Errores de RTA

Para solucionar los errores de RTA, compruebe primero el registro de errores de RTA que se almacena en la carpeta RTALogs (Registros de RTA). Este archivo no está presente para los experimentos realizados con éxito. Los archivos se encuentran en carpetas específicas del experimento de la carpeta de resultados. Incluya el registro de errores al notificar los problemas al servicio de asistencia técnica de Illumina.

## Solución de errores de la comprobación automática

Si se producen errores durante la comprobación automática, lleve a cabo las medidas recomendadas que se indican a continuación para solucionar el error.

Sin embargo, las RFID de la celda de flujo, el cartucho de reactivos y el cartucho de tampones se bloquearán durante la inicialización del software de control, lo que puede ser necesario para resolver un error. El usuario debe retirar la celda de flujo, el cartucho de reactivos y el cartucho de tampones del instrumento antes de que el sistema se reinicie. Además, las RFID de los consumibles se bloquean después de que se haya perforado el sello metálico.

Comprobaciones del sistema	Acción recomendada
Doors Closed (Puertas cerradas)	Asegúrese de que las puertas del compartimento estén cerradas.
Consumables Loaded (Consumibles cargados)	Los sensores de los consumibles no registran debidamente. Asegúrese de que todos los consumibles estén bien cargados. En las pantallas de configuración del experimento, seleccione <b>Back</b> (Atrás) para volver al paso de carga y repita la configuración del experimento.
Required Software (Software necesario)	Faltan los componentes críticos del software. Lleve a cabo una actualización manual del software para restablecer todos los componentes del software.
Instrument Disk Space (Espacio de disco del instrumento)	El disco duro del instrumento no tiene suficiente espacio para ejecutar un experimento. Es posible que no se hayan transferido los datos de un experimento anterior. Borre los datos del experimento del disco duro del instrumento.



Comprobaciones del sistema	Acción recomendada
Network Connection (Conexión de red)	La conexión de red se ha interrumpido. Compruebe el estado de la red y la conexión de red física.
Network Disk Space (Espacio de disco de la red)	La cuenta de BaseSpace o el servidor de red están llenos.

Temperatura	Acción recomendada
Temperatura	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Temperature Sensors (Sensores de temperatura)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Fans (Ventiladores)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

Sistema de adquisición de imágenes	Acción recomendada
Imaging Limits (Límites de adquisición de imágenes)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Z Steps-and-Settle (Pasos y asentamiento de la platina Z)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Bit Error Rate (Tasa de errores de bits)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Flow Cell Registration (Registro de la celda de flujo)	<p>Es posible que la celda de flujo no esté bien colocada.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• En las pantallas de configuración del experimento, seleccione <b>Back</b> (Atrás) para volver al paso de la celda de flujo. La puerta del compartimento de adquisición de imágenes se abre.</li> <li>• Descargue y vuelva a cargar la celda de flujo para asegurarse de que esté bien colocada.</li> </ul>

Administración de reactivos	Acción recomendada
Valve Response (Respuesta de la válvula)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Pump (Bomba)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Buffer Mechanism (Mecanismo de los tampones)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Spent Reagents Empty (Reactivos usados vaciados)	Vacíe el contenedor de reactivos usados y vuelva a cargar el contenedor ya vacío.

## Contenedor de reactivos usados lleno

Inicie siempre un experimento con un contenedor de reactivos usados vacío.

Si inicia un experimento sin un contenedor vacío, cuando el contenedor se llena, los sensores del sistema activan el software para que detenga el experimento. Los sensores del sistema no pueden pausar un experimento durante la generación de grupos, la resíntesis "paired-end" ni el lavado automático posterior al experimento.

Cuando se pausa el experimento, se abre un cuadro de diálogo con opciones para levantar los dispensadores y vaciar el contenedor lleno.

## Vaciado del contenedor de reactivos usados

- 1 Seleccione **Raise Sippers** (Levantar dispensadores).

- 2 Retire el contenedor de reactivos usados y deseche el contenido de manera adecuada.
- 3 Vuelva a colocar el contenedor vacío en el compartimento de tampones.
- 4 Seleccione **Continue** (Continuar). El experimento se reanuda automáticamente.

## Flujo de trabajo de la rehibridación

Es posible que se deba realizar un experimento de rehibridación si los criterios de medición generados durante los primeros ciclos muestran intensidades por debajo de 2500. Algunas bibliotecas con poca diversidad pueden mostrar intensidades por debajo de 1000, lo que es previsible y no se puede resolver con la rehibridación.



### NOTA

El comando End Run (Finalizar experimento) es definitivo. No es posible reanudar el experimento, no se pueden reusar los consumibles del experimento y tampoco se guardan los datos de secuenciación del experimento.

Cuando el usuario finaliza un experimento, el software lleva a cabo los pasos siguientes antes de que el experimento termine:

- ▶ Coloca la celda de flujo en un estado seguro.
- ▶ Desbloquea la RFID de la celda de flujo para un experimento posterior.
- ▶ Asigna una fecha de caducidad de rehibridación a la celda de flujo.
- ▶ Escribe los registros del experimento para los ciclos realizados. Suele producirse un retraso.
- ▶ Omite el lavado automático posterior al experimento.

Cuando inicie un experimento de rehibridación, el software realizará los pasos siguientes para llevar a cabo el experimento:

- ▶ Crea una carpeta de experimento con un nombre basado en un nombre único del experimento.
- ▶ Comprueba que la fecha de rehibridación de la celda de flujo no haya caducado.
- ▶ Ceba los reactivos. Suele producirse un retraso.
- ▶ Se salta el paso de generación de grupos.
- ▶ Elimina el cebador de Lectura 1 anterior.
- ▶ Hibrida un cebador de Lectura 1 nuevo.
- ▶ Continúa con la Lectura 1 y el resto del experimento según los parámetros del experimento especificados.

## Puntos para finalizar un experimento de rehibridación

La posterior rehibridación solo es posible si finaliza el experimento en los puntos siguientes:

- ▶ **Después del ciclo 5:** las intensidades aparecen tras el registro de la cadena molde, para lo que son necesarios los primeros cinco ciclos de secuenciación. Aunque es seguro finalizar un experimento después del ciclo 1, se recomienda finalizarlo después del ciclo 5. No finalice un experimento durante la generación de grupos.
- ▶ **Lectura 1 o Lectura de Índice 1:** finalice el experimento *antes* de iniciar la resíntesis "paired-end". La celda de flujo no se puede guardar para la posterior rehibridación una vez iniciada la resíntesis "paired-end".

## Consumibles necesarios

Para efectuar un experimento de rehibridación, hay que contar con un cartucho de tampones y un cartucho de reactivos de NextSeq nuevos, independientemente de cuándo se haya detenido el experimento.

## Finalización del experimento actual

- 1 Seleccione **End Run** (Finalizar experimento). Cuando se le pregunte si quiere confirmar el comando, seleccione **Yes** (Sí).
- 2 Cuando se le pregunte si quiere guardar la celda de flujo, seleccione **Yes** (Sí). Al guardar la celda de flujo no se garantiza que el experimento actual pueda rescatarse. Tenga en cuenta la fecha de caducidad para la rehibridación.
- 3 Retire la celda de flujo guardada y resérvela a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C hasta que esté listo para configurar el experimento de rehibridación.



### NOTA

Puede almacenar la celda de flujo hasta siete días a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C en el estuche protector de plástico *sin* el paquete desecante. Para obtener los mejores resultados, rehibride la celda de flujo guardada antes de que transcurran tres días.

## Realización de un lavado manual

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Perform Wash** (Realizar lavado).
- 2 En la pantalla Wash Selection (Selección de lavado), seleccione **Manual Post-Run Wash** (Lavado manual posterior al experimento). Consulte *Realización de un lavado manual en la página 29*.



### NOTA

Si no ha retirado el cartucho de reactivos y el cartucho de tampones del experimento detenido, puede usarlos para el lavado manual. De lo contrario, lleve a cabo un lavado manual con el cartucho de lavado de reactivos y el cartucho de lavado de tampones.

## Configuración de un experimento nuevo en BaseSpace Sequence Hub

- 1 Si BaseSpace Sequence Hub está en uso, configure un experimento nuevo usando los mismos parámetros que en el experimento original.



### SUGERENCIA

Haga clic en la ficha Pools (Grupos), seleccione el ID de grupo adecuado para conservar los parámetros del experimento anterior y, a continuación, asigne un nombre único al experimento nuevo.

## Configuración de un experimento en el instrumento

- 1 Prepare un cartucho de reactivos nuevo.
- 2 Si se ha almacenado la celda de flujo guardada, deje que alcance la temperatura ambiente (15-30 minutos).
- 3 Limpie y cargue la celda de flujo guardada.
- 4 Retire el contenedor de reactivos usados y deseche el contenido de manera adecuada; a continuación, vuelva a cargar el contenedor vacío.

- 5 En la pantalla Run Setup (Configuración del experimento), seleccione uno de los siguientes modos de experimento.
  - ▶ Local Run Manager
  - ▶ Manual
- 6 **[Opcional]** Seleccione **Use BaseSpace Sequence Hub Setting** (Usar ajustes de BaseSpace Sequence Hub) y seleccione uno de los siguientes.
  - ▶ Run Monitoring and Storage (Almacenamiento y supervisión del experimento)
  - ▶ Run Monitoring Only (Solo supervisión del experimento)
 Introduzca su nombre de usuario y contraseña de BaseSpace Sequence Hub.
- 7 Cargue el nuevo cartucho de tampones y el nuevo cartucho de reactivos.
- 8 Seleccione **Next** (Siguiente) para continuar con la comprobación previa al experimento e inicie el experimento.


## Fórmulas personalizadas y carpetas de fórmulas

No modifique las fórmulas originales: realice siempre una copia de la original con un nuevo nombre. Si se modifica una fórmula original, el actualizador de software ya no podrá reconocerla para las actualizaciones posteriores y no se instalarán versiones más recientes.

Guarde las fórmulas personalizadas en la carpeta de fórmulas correspondiente. Las carpetas de fórmulas se organizan como se indica a continuación.

### Custom (Personalizado)

 **High (Elevado)**: fórmulas personalizadas que se usan con un kit de rendimiento elevado.

 **Mid (Medio)**: fórmulas personalizadas que se usan con un kit de rendimiento medio.

 **High (Elevado)**: fórmulas originales que se usan con un kit de rendimiento elevado.

 **Mid (Medio)**: fórmulas originales que se usan con un kit de rendimiento medio.

 **Wash (Lavado)**: contiene la fórmula de lavado manual.

## Comprobación del sistema

No se precisa ejecutar ninguna comprobación del sistema para el funcionamiento normal o el mantenimiento del instrumento. No obstante, un representante del servicio de asistencia técnica de Illumina puede solicitarle que ejecute una comprobación del sistema para solucionar posibles problemas.



### NOTA

Si se debe realizar un lavado del instrumento, realícelo antes de iniciar una comprobación del sistema.

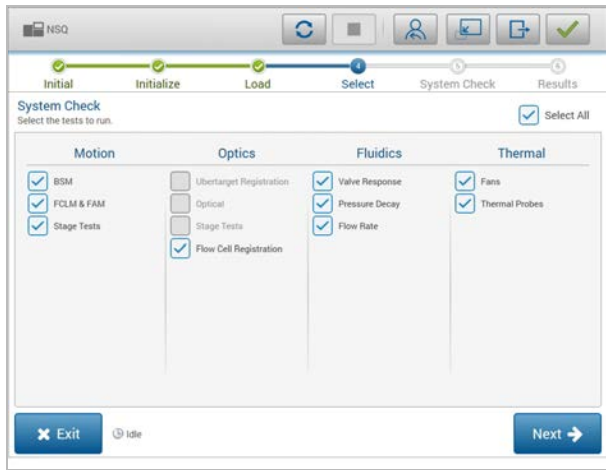
Al iniciar una comprobación del sistema, se cierra automáticamente el software de control y se inicia NextSeq Service Software (NSS). El software de servicio se inicia y se abre una página de inicio de sesión. Use cualquier credencial de nombre de usuario y contraseña de Local Run Manager (Nivel de administrador o usuario) para acceder a NSS. Una vez autenticado, se abre NSS en la pantalla Load (Cargar), que está configurada para usarla opción de carga avanzada



### NOTA

Las credenciales de usuario administrador de Local Run Manager necesitan usarse para iniciar sesión en el software del servicio antes de que aparezca la pantalla Load (Cargar).

Figura 23 Comprobaciones del sistema disponibles



Las casillas de verificación desactivadas de la pantalla Select (Selección) indican pruebas que requieren la asistencia de un representante del servicio de campo de Illumina.

## Realización de una comprobación del sistema

- 1 En la pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento), seleccione **System Check** (Comprobación del sistema). Cuando se le solicite cerrar el software de control, seleccione **Yes** (Sí).
- 2 Cargue los consumibles como se describe a continuación:
  - a Si todavía no hay ninguna celda de flujo usada en el instrumento, cargue una.



### NOTA

Illumina recomienda usar una celda de flujo de rendimiento elevado para las comprobaciones del sistema.

- b Vacíe el contenedor de reactivos usados y vuelva a colocarlo en el instrumento.
  - c Cargue el cartucho de lavado de tampones que contiene 120 ml de agua de laboratorio en el depósito central.
  - d Cargue el cartucho de lavado de reactivos. Asegúrese de que el cartucho de lavado de reactivos está limpio y vacío.
- 3 Seleccione **Load** (Cargar). El software mueve la celda de flujo y el cartucho de lavado de reactivos a su posición. Seleccione **Next** (Siguiendo).
  - 4 Seleccione **Next** (Siguiendo). Se inicia la comprobación del sistema.
  - 5 **[Opcional]** Cuando haya finalizado la comprobación del sistema, seleccione **View** (Visualizar) junto al nombre de comprobación para visualizar los valores asociados a cada comprobación.
  - 6 Seleccione **Next** (Siguiendo). Se abre el informe de comprobación del sistema.
  - 7 Seleccione **Save** (Guardar) para guardar el informe en un archivo comprimido. Vaya a una ubicación de red para guardar el archivo.
  - 8 Cuando termine, seleccione **Exit** (Salir).
  - 9 Cuando se le solicite cerrar el software de servicio y reiniciar el software de control, seleccione **Yes** (Sí). El software de control se reinicia automáticamente.

## Comprobaciones de movimiento

Comprobación del sistema	Descripción
BSM	Comprueba la ganancia y la distancia del mecanismo de aspiración del tampón (BSM, Buffer Straw Mechanism) para confirmar que el módulo funciona correctamente.
FCLM y FAM	Comprueba la ganancia y la distancia del mecanismo de carga de la celda de flujo (FCLM, Flow Cell Load Mechanism) y del módulo de automatización de fluidos (FAM, Fluid Automation Module) para confirmar que los módulos funcionan correctamente.
Stage Tests (Pruebas de platina)	Comprueba los límites de desplazamiento y el rendimiento de la platina X e Y y las seis platinas Z, una para cada cámara.

## Comprobación del sistema óptico

Comprobación del sistema	Descripción
Flow Cell Registration (Registro de la celda de flujo)	Mide la inclinación de la celda de flujo en un plano óptico, comprueba la función de la cámara, comprueba el módulo de adquisición de imágenes y verifica el registro de la celda de flujo en la posición correcta de adquisición de imágenes.

## Comprobaciones de la fluídica

Comprobación del sistema	Descripción
Valve Response (Respuesta de la válvula)	Comprueba la precisión de los movimientos de la válvula y la bomba, así como la amplitud de movimiento de la jeringa de la bomba.
Pressure Decay (Caída de la presión)	Comprueba la tasa de fuga de un sistema de fluídica con cierre, que confirma que la celda de flujo está bien montada en la posición de secuenciación.
Flow Rate (Velocidad de flujo)	Comprueba el funcionamiento de los sensores de burbujas, que se usan para detectar la presencia de aire en los conductos de reactivos. Mide la velocidad de flujo para detectar oclusiones o fugas.

## Comprobaciones térmicas

Comprobación del sistema	Descripción
Fans (Ventiladores)	Comprueba la velocidad de los ventiladores del sistema en pulsos por minuto (PPM) para confirmar que los ventiladores funcionan. Los ventiladores que no funcionan devuelven un valor negativo.
Thermal Probes (Sondas térmicas)	Comprueba la temperatura media de cada sensor térmico. Los sensores térmicos que no funcionan devuelven un valor negativo.

## Mensaje de error de RAID

El ordenador de NextSeq está equipado con dos discos duros. Si un disco duro empieza a fallar, el sistema genera un mensaje de error de RAID y le sugiere que se ponga en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina. Normalmente, es necesario sustituir un disco duro.

Puede proceder con los pasos de configuración del experimento y el funcionamiento normal. El propósito del mensaje es planificar los trabajos de mantenimiento de forma anticipada para evitar interrupciones en el funcionamiento normal del instrumento. Para continuar, seleccione **Acknowledge** (Aceptar) y, a continuación, **Close** (Cerrar).

## Error de almacenamiento en red

Los errores de almacenamiento en red son el resultado de una de las siguientes razones:

- ▶ **Espacio de almacenamiento insuficiente para la carpeta de resultados:** aumente la cantidad de espacio disponible en el dispositivo de almacenamiento o mueva la carpeta de resultados a una ubicación con suficiente almacenamiento.
- ▶ **No se puede conectar con el almacenamiento en red:** compruebe la ruta a la carpeta de resultados. Consulte *Configuración de la ubicación de la carpeta de resultados en la página 46*.
- ▶ **El sistema no puede escribir en el almacenamiento en red:** consulte al administrador de TI para comprobar los permisos. En la cuenta de Windows en el sistema operativo del instrumento hacen falta permisos de lectura y escritura de la carpeta de resultados.

En la cuenta de Windows en Local Run Manager también hacen falta permisos de lectura y escritura de la carpeta de resultados. Consulte Especificación de los ajustes de la cuenta de servicio en la *Guía del software Local Run Manager (n.º de documento 100000002702)*.

## Configuración de ajustes del sistema

El sistema se configura durante la instalación. No obstante, si es necesario realizar un cambio o si el sistema se debe volver a configurar, use las opciones de configuración del sistema.

- ▶ **Network Configuration (Configuración de red):** proporciona opciones de ajuste de dirección IP, dirección de servidor de nombres de dominio (DNS, Domain Name Server), nombre del ordenador y nombre de dominio.
- ▶ **BaseSpace Sequence Hub:** si está en uso BaseSpace Sequence Hub, proporciona opciones para la ubicación a la que se transferirán los datos para su almacenamiento y análisis.
- ▶ **Output Folder Location (Ubicación de la carpeta de resultados):** proporciona opciones de ruta a la carpeta de resultados.

## Ajuste de la configuración de red


- 1 En la pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento), seleccione **System Configuration** (Configuración del sistema).
- 2 Seleccione **Network Configuration** (Configuración de red).
- 3 Seleccione **Obtain an IP address automatically** (Obtener una dirección IP de forma automática) para obtener la dirección IP mediante el uso del servidor DHCP.



### NOTA

El protocolo de configuración de host dinámico (DHCP, Dynamic Host Configuration Protocol) es un protocolo de red estándar que se usa en redes IP para distribuir de forma dinámica los parámetros de configuración de la red.

Por otra parte, también puede seleccionar **Use the following IP address** (Usar la dirección IP siguiente) para conectar el instrumento a otro servidor de forma manual, como se indica a continuación. Póngase en contacto con el administrador de su red para obtener las direcciones específicas del centro.

- ▶ Introduzca una dirección IP. La dirección IP es una serie de cuatro números separados por un punto. Por ejemplo, 168.62.20.37.
  - ▶ Introduzca la máscara de subred, que es una subdivisión de la red IP.
  - ▶ Introduzca la puerta de enlace predeterminada, que es el enrutador de la red que se conecta a Internet.
- 4 Seleccione **Obtain a DNS server address automatically** (Obtener una dirección de servidor DNS de forma automática) para conectar el instrumento al servidor de nombres de dominio asociado con la dirección IP.
- De forma alternativa, seleccione **Use the following DNS server addresses** (Usar las siguientes direcciones de servidor DNS) para conectar el instrumento al servidor de nombres de dominio manualmente del modo siguiente.
- ▶ Introduzca la dirección DNS deseada. La dirección DNS es el nombre del servidor usado para traducir nombres de dominio en direcciones IP.
  - ▶ Introduzca la dirección DNS alternativa. La dirección alternativa se usa si la DNS no puede traducir un nombre de dominio concreto en una dirección IP.
- 5 Seleccione **Save** (Guardar) para pasar a la pantalla Computer (Ordenador).
-  **NOTA**
- El nombre del ordenador del instrumento se asigna al ordenador del instrumento en el momento de su fabricación. Cualquier cambio realizado en el nombre del ordenador puede afectar a la conectividad y requerir un administrador de red.
- 6 Conecte el ordenador del instrumento a un dominio o grupo de trabajo, como se explica a continuación.
- ▶ **Para instrumentos conectados a Internet:** seleccione **Member of domain** (Miembro del dominio) y, a continuación, introduzca el nombre de dominio asociado a la conexión a Internet de su centro. Los cambios de dominio requieren un nombre y contraseña de usuario de administrador.
  - ▶ **Para instrumentos no conectados a Internet:** seleccione **Member of work group** (Miembro del grupo de trabajo) y, a continuación, introduzca el nombre del grupo de trabajo. El nombre del grupo de trabajo es exclusivo de su centro.
- 7 Seleccione **Save** (Guardar).

## Ajuste de la configuración de BaseSpace

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **System Configuration** (Configuración del sistema).
- 3 Seleccione **BaseSpace Sequence Hub Configuration** (Configuración de BaseSpace Sequence Hub).
- 4 Seleccione una de las siguientes opciones para especificar la ubicación a la que se transfieren los datos para su análisis.
  - ▶ En la lista Hosting Location (Ubicación de alojamiento), seleccione la ubicación del servidor en el que se cargan los datos.
  - ▶ Si cuenta con una suscripción Enterprise, seleccione la casilla de verificación **Private Domain** (Dominio privado) e introduzca el nombre del dominio (URL) usado para el inicio de sesión individual en BaseSpace Sequence Hub.

Por ejemplo: <https://sulaboratorio.basespace.illumina.com>.



- 5 Seleccione la opción **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar datos de rendimiento del instrumento a Illumina) para activar el servicio de supervisión Illumina Proactive. El nombre del ajuste en la interfaz de software puede diferir del nombre que figura en esta guía, en función de la versión del NCS que se esté usando.

Con este ajuste activado, los datos del rendimiento del instrumento se envían a Illumina. Estos datos ayudan a Illumina a solucionar problemas de forma más sencilla y a detectar posibles fallos, lo que permite llevar a cabo tareas de mantenimiento proactivo y maximizar el tiempo de actividad del instrumento. Para obtener más información sobre las ventajas de este servicio, consulte la *Nota técnica de Illumina Proactive* (n.º de documento 1000000052503).

Tenga en cuenta lo siguiente en relación con este servicio:

- ▶ No envía datos de secuenciación.
- ▶ Requiere que el instrumento esté conectado a una red con acceso a Internet.
- ▶ Está activado de manera predeterminada. Para desactivar este servicio, desactive el ajuste **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar datos de rendimiento del instrumento a Illumina).

- 6 Seleccione **Save** (Guardar).

## Configuración de la ubicación de la carpeta de resultados

En NextSeq hace falta una carpeta de resultados para todos los experimentos. Use la ruta completa Universal Naming Convention (UNC) para la carpeta de resultados. La ruta UNC incluye dos barras invertidas, el nombre del servidor y el de directorio, pero **no** la letra de una unidad de red asignada.

- ▶ En las rutas a la carpeta de resultados de un nivel hace falta una barra invertida final.
  - ▶ Ejemplo de ruta UNC: \\nombredeservidor\directorio1\
- ▶ En las rutas a la carpeta de resultados de dos o más niveles no hace falta una barra invertida final.
  - ▶ Ejemplo de ruta UNC: \\nombredeservidor\directorio1\directorio2
- ▶ Las rutas a una unidad de red asignada causan errores. **No las use.**
  - ▶ Ejemplo de una ruta de unidad de red asignada: T:\sbsfiles

En el modo de experimento de Local Run Manager, configure la ubicación de la carpeta de resultados en el software Local Run Manager. Para obtener más información, consulte la *Guía del software Local Run Manager* (n.º de documento 1000000002702).

# Apéndice B Análisis en tiempo real

Descripción general de Análisis en tiempo real .....	47
Flujo de trabajo de análisis en tiempo real .....	48
Archivos de resultados de secuenciación .....	52
Placas de la celda de flujo .....	52
Estructura de la carpeta de resultados .....	56

## Descripción general de Análisis en tiempo real

NextSeq 500 usa una implementación del software de análisis en tiempo real (RTA, Real-Time Analysis) denominada RTA v2. RTA2 se ejecuta en el ordenador del instrumento y extrae las intensidades de las imágenes, realiza una llamada de bases y asigna una puntuación de calidad a dicha llamada de bases. RTA2 y el software de control se comunican a través de una interfaz web HTTP y de archivos de memoria compartidos. Si RTA2 se interrumpe, el procesamiento no se reanuda y los datos del experimento no se guardan.



### NOTA

No se calcula el rendimiento de demultiplexado. En consecuencia, la ficha Index (Índice) de Sequencing Analysis Viewer (SAV) aparece vacía.

## Entradas de RTA2

RTA2 precisa las siguientes entradas principales:

- ▶ Las imágenes de las placas contenidas en la memoria del sistema local.
- ▶ **RunInfo.xml**, que se genera automáticamente al inicio del experimento. El archivo proporciona la siguiente información.
  - ▶ Nombre del experimento
  - ▶ Número de ciclos
  - ▶ Si se indexa una lectura
  - ▶ Número de placas en la celda de flujo
- ▶ **RTA.exe.config**, que es un archivo de configuración de software en formato XML.

RTA2 recibe comandos del software de control que indican la ubicación de **RunInfo.xml** y si se ha especificado una carpeta de resultados opcional.

## Archivos de resultados de RTA v2

Las imágenes de cada canal se transfieren en memoria como placas. Las placas son pequeñas áreas de adquisición de imágenes en la celda de flujo definidas como el campo de visión por la cámara. A partir de estas imágenes, el software produce un resultado en forma de conjunto de archivos de filtro y archivos de llamadas de bases con puntuación de calidad. Todos los demás archivos admiten archivos de resultados.

Tipo de archivo	Descripción
Archivos de llamada de bases (*.bcl)	Cada placa que se analiza se incluye en un archivo de llamadas de bases agregado para cada carril y para cada ciclo. El archivo de llamadas de bases agregado contiene la llamada de bases y la puntuación de calidad asociada para cada grupo en ese carril.
Archivos de filtro (*.filter)	Cada placa produce información de filtro que se agrega a un archivo de filtro para cada carril. El archivo de filtro especifica si un grupo ha superado los filtros.

Tipo de archivo	Descripción
Archivos de ubicación de grupos (*.locs)	Los archivos de ubicación de grupos contienen las coordenadas X e Y para cada grupo en una placa. Durante la generación de plantillas, se genera un archivo de ubicación de grupos para cada carril.
Archivos de índice de llamada de bases (*.bci)	Se produce un archivo de índice de llamada de bases para cada carril con el fin de preservar la información de placa original. El archivo de índice contiene un par de valores para cada placa, que son el número de placa y el número de grupos para esa placa.

Los archivos de resultados se usan para los análisis sucesivos en BaseSpace. De manera alternativa, use el software de conversión bcl2fastq para la conversión de FASTQ y soluciones de análisis de otros proveedores. Los archivos de NextSeq requieren bcl2fastq v2.0 o una versión posterior. Para obtener la última versión de bcl2fastq, visite la [página de descargas de NextSeq](#) en el sitio web de Illumina.

RTA v2 proporciona criterios de medición en tiempo real de experimentos de calidad guardados como archivos InterOp. Los archivos InterOp son archivos de resultados binarios que contienen criterios de medición relacionados con placas, ciclos y lecturas y son necesarios para la visualización de criterios de medición en tiempo real con Sequencing Analysis Viewer (SAV). Para obtener la última versión de SAV, visite la [página de descargas de SAV](#) en el sitio web de Illumina.

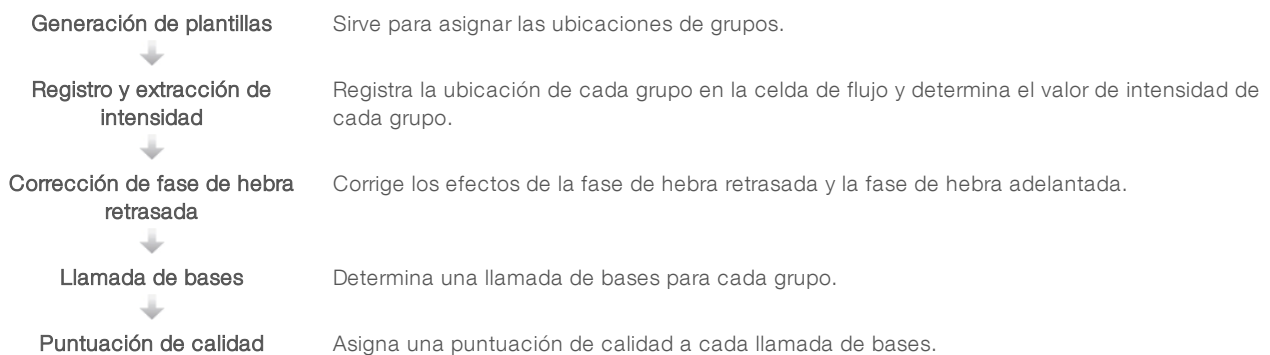
## Gestión de errores

RTA2 crea archivos de registro y los guarda en la carpeta RTALogs (Registros de RTA). Los errores se registran en un archivo de errores con formato \*.tsv.

Los archivos de errores y de registro siguientes se transfieren a la ubicación de destino de los resultados finales tras completar el procesamiento:

- ▶ \*GlobalLog\*.tsv contiene un resumen de los eventos importantes del experimento.
- ▶ \*LaneNLog\*.tsv enumera los eventos de procesamiento de cada carril.
- ▶ \*Error\*.tsv enumera los errores que se han producido durante un experimento.
- ▶ \*WarningLog\*.tsv enumera las advertencias que se han producido durante un experimento.

## Flujo de trabajo de análisis en tiempo real



## Generación de plantillas

El primer paso del flujo de trabajo de RTA es la generación de plantillas, que define la posición de cada grupo en una placa mediante el uso de las coordenadas X e Y.

La generación de plantillas requiere los datos de imagen de los cinco primeros ciclos del experimento. Tras el último ciclo de la plantilla para la adquisición de imágenes de una placa, se genera la plantilla.



### NOTA

Para detectar un grupo durante la generación de plantillas, debe haber como mínimo una base distinta de G en los primeros **cinco** ciclos. Para las secuencias de índice, RTA v2 precisa como mínimo una base distinta de G en los primeros **dos** ciclos.

La plantilla se usa como referencia para el siguiente paso de registro y extracción de intensidad. Las posiciones de los grupos para el conjunto de la celda de flujo se escriben en archivos de ubicación de grupos (\*.locs), uno para cada carril.

## Registro y extracción de intensidad

El registro y la extracción de intensidad comienza después de la generación de plantillas.

- ▶ El registro alinea imágenes producidas durante cada ciclo de adquisición de imágenes posterior en relación con la plantilla.
- ▶ La extracción de intensidad determina un valor de intensidad para cada grupo de la plantilla para una imagen determinada.

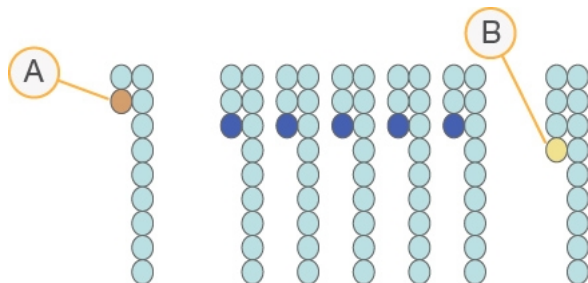
Si se produce un error en el registro de cualquier imagen en un ciclo, no se generará ninguna llamada de bases para esa placa en ese ciclo. Use el software del Sequencing Analysis Viewer (SAV) para examinar las imágenes en miniatura e identificar las imágenes que no se han podido registrar.

## Corrección de fase de hebra retrasada

Durante la reacción de secuenciación, cada cadena de ADN de un grupo se amplía en una base por cada ciclo. La fase de hebra retrasada y fase de hebra adelantada se producen cuando una cadena queda fuera de su lugar con respecto al ciclo de incorporación actual.

- ▶ La fase de hebra retrasada se produce cuando una base se atrasa.
- ▶ La fase de hebra adelantada se produce cuando una base se avanza.

**Figura 24** Fase de hebra retrasada y fase de hebra adelantada



- A Lectura con una base con fase de hebra retrasada
- B Lectura con una base con fase de hebra adelantada

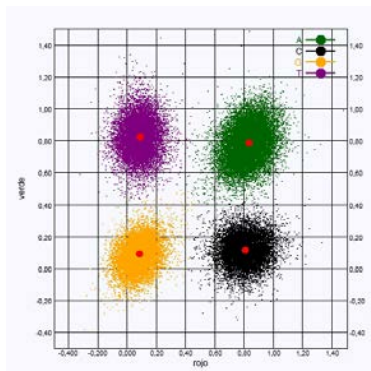
RTA2 corrige los efectos de la fase de hebra retrasada y fase de hebra adelantada, lo que aumenta al máximo la calidad de los datos en cada uno de los ciclos del experimento.

## Llamada de bases

La llamada de bases determina una base (A, C, G o T) para cada grupo de una placa determinada en un ciclo específico. NextSeq 500 utiliza secuenciación de dos canales, que precisa solo dos imágenes para codificar los datos de cuatro bases de ADN: una del canal rojo y otra del canal verde.

Las intensidades extraídas de una imagen en comparación con otra imagen dan como resultado cuatro poblaciones distintas, cada una de las cuales corresponde a un nucleótido. El proceso de llamada de bases determina a qué población pertenece cada grupo.

**Figura 25** Visualización de intensidades de grupos



**Tabla 1** Llamadas de bases en la secuenciación de dos canales

Base	Canal rojo	Canal verde	Resultado
A	1 (encendido)	1 (encendido)	Grupos que presentan intensidad en el canal rojo y verde.
C	1 (encendido)	0 (apagado)	Grupos que presentan intensidad solo en el canal rojo.
G	0 (apagado)	0 (apagado)	Grupos que no presentan intensidad en una ubicación de grupos conocida.
T	0 (apagado)	1 (encendido)	Grupos que presentan intensidad solo en el canal verde.

## Grupos que superan el filtro

Durante el experimento, RTA2 filtra los datos sin procesar para eliminar las lecturas que no satisfagan el umbral de calidad de los datos. Los grupos que se solapan o de baja calidad se eliminan.

En el caso del análisis de dos canales, RTA2 usa un sistema basado en la población para determinar la castidad de una llamada de bases. Los grupos superan el filtro (PF, Pass Filter) cuando no más de una llamada de bases en los primeros 25 ciclos tiene una castidad de <0,63. En los grupos que no superan el filtro, no se realiza la llamada de bases.

## Consideraciones sobre el indexado

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

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

Para aumentar la solidez del demultiplexado, seleccione secuencias de índices que proporcionen señal en al menos un canal, preferiblemente los dos canales, por cada ciclo. Al seguir esta guía, se evitan las combinaciones de índices que solo dan lugar a bases G en cualquier ciclo.

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

Este proceso de llamada de bases garantiza la precisión al analizar muestras de bajo plexado.

## Puntuación de calidad

Una puntuación de calidad, o puntuación Q, es una predicción de la probabilidad de obtener una llamada de bases incorrecta. Una puntuación Q superior implica que la llamada de bases tiene una calidad mayor y es más probable que sea correcta.

La puntuación Q es una forma concisa de comunicar probabilidades de error pequeñas. Q(X) representa puntuaciones de calidad, donde X es la puntuación. En la siguiente tabla, figura la relación entre la puntuación de calidad y la probabilidad de error.

Puntuación Q, Q(X)	Probabilidad de error
Q40	0,0001 (1 entre 10 000)
Q30	0,001 (1 entre 1000)
Q20	0,01 (1 entre 100)
Q10	0,1 (1 entre 10)



### NOTA

La puntuación de calidad se basa en una versión modificada del algoritmo Phred.

Para la puntuación de calidad, se calcula un conjunto de predictores para cada llamada de bases y, a continuación, se usan los valores de los predictores para determinar la puntuación Q en la tabla de calidad. Las tablas de calidad se crean para proporcionar predicciones de calidad con una precisión óptima de experimentos generados mediante una configuración específica de la plataforma de secuenciación y una versión de composición química concreta.

Tras determinar la puntuación Q, los resultados se registran en archivos de llamada de bases.

## Archivos de resultados de secuenciación

Tipo de archivo	Descripción, ubicación y nombre del archivo
Archivos de llamadas de bases	Cada placa analizada se incluye en un archivo de llamadas de bases, agregado en un archivo para cada carril y para cada ciclo. El archivo agregado contiene la llamada de bases y la puntuación de calidad codificada para cada grupo en ese carril. <b>Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]</b> : los archivos se almacenan en una carpeta para cada carril. <b>[Ciclo].bcl.bgzf</b> , donde [Ciclo] representa el número de ciclo de cuatro dígitos. Los archivos de llamadas de bases se comprimen mediante el uso de la compresión de bloques gzip.
Archivo de índice de llamadas de bases	Para cada carril, un archivo de índice binario recopila la información de placas original en un par de valores para cada placa, que son el número de placa y el número de grupos para la placa. Los archivos de índice de llamadas de bases se generan al crear por primera vez un archivo de llamadas de bases para ese carril. <b>Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]</b> : los archivos se almacenan en una carpeta para cada carril. <b>s_[Carril].bci</b>
Archivos de ubicación de grupos	Para cada placa, las coordenadas X e Y de cada grupo se agregan a un archivo de ubicación de grupos para cada carril. Los archivos de ubicación de grupos son el resultado de la generación de plantillas. <b>Data\Intensities\L00[X]</b> : los archivos se almacenan en una carpeta para cada carril. <b>s_[carril].locs</b>
Archivos de filtro	El archivo de filtro especifica si un grupo ha superado los filtros. La información de filtro se agrega a un archivo de filtro para cada carril y lectura. Estos archivos se generan en el ciclo 26 mediante el uso de 25 ciclos de datos. <b>Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]</b> : los archivos se almacenan en una carpeta para cada carril. <b>s_[carril].filter</b>
Archivos InterOp	Archivos de informes binarios usados por Sequencing Analysis Viewer (SAV). Los archivos InterOp se actualizan durante el experimento. Carpeta <b>InterOp</b>
Archivo de configuración de RTA	Creado al inicio del experimento, el archivo de configuración de RTA contiene los ajustes del experimento. <Nombre de carpeta de experimento>, <b>RTAConfiguration.xml</b>
Archivo de información del experimento	Indica el nombre del experimento, el número de ciclos de cada lectura, si es una lectura indexada y el número de sectores y placas de la celda de flujo. El archivo de información del experimento se crea al inicio del experimento. <Nombre de carpeta de experimento>, <b>RunInfo.xml</b>
Archivos de vistas en miniatura	Una imagen en miniatura para cada canal de color (rojo y verde) para las placas 1, 6 y 12 de todas las cámaras, superficies superiores e inferiores, en cada ciclo durante la adquisición de imágenes. <b>Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1]</b> : los archivos se almacenan en una carpeta para cada carril y una subcarpeta para cada ciclo. <b>s_[carril]_[placa]_[canal].jpg</b> : en el nombre de archivo, la placa se representa con un número de cinco dígitos que indica la superficie, el sector, la cámara y la placa. Para obtener más información, consulte <i>Numeración de placas en la página 55</i> y <i>Asignación de nombre a imágenes en miniatura en la página 55</i> .

## Placas de la celda de flujo

Las placas son pequeñas áreas de adquisición de imágenes en la celda de flujo definidas como el campo de visión por la cámara. El número total de placas depende del número de imágenes de carriles, sectores y superficies adquiridas en la celda de flujo y del funcionamiento conjunto de las cámaras para la obtención de las imágenes.

- ▶ Las celdas de flujo de rendimiento elevado tienen un total de 864 placas.
- ▶ Las celdas de flujo de rendimiento medio tienen un total de 288 placas.

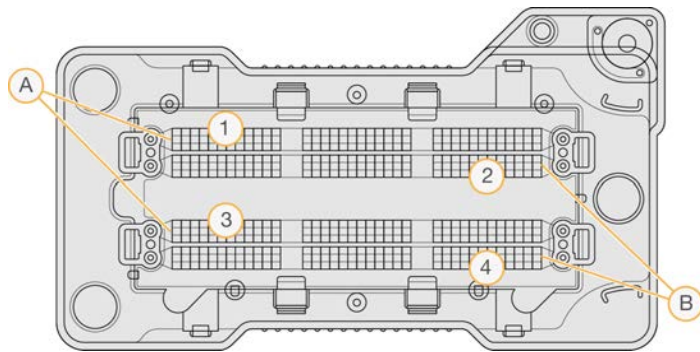
**Tabla 2 Placas de la celda de flujo**

Componente de la celda de flujo	Rendimiento elevado	Rendimiento medio	Descripción
Carriles	4	4	Un carril es un canal físico con puertos de entrada y salida específicos.
Superficies	2	2	La imagen de la celda de flujo se adquiere en dos superficies, la superior y la inferior. Primero se adquiere la imagen de la superficie superior de una placa y, a continuación, la imagen de la superficie inferior de la misma placa antes de pasar a la placa siguiente.
Sectores por carril	3	1	Un sector es una columna de placas en un carril.
Segmentos de cámara	3	3	El instrumento usa seis cámaras para la adquisición de imágenes de la celda de flujo en tres segmentos para cada carril.
Placas por sector por segmento de cámara	12	12	Una placa es el área de la celda de flujo que la cámara ve como una imagen.
Total de imágenes de placas	864	288	El número total de placas equivale a carriles × superficies × sectores × segmentos de cámara × placas por sector por segmento.

## Numeración de carriles

Las imágenes de los carriles 1 y 3, conocidos como par de carriles A, se adquieren al mismo tiempo. Las imágenes de los carriles 2 y 4, conocidos como par de carriles B, se adquieren tras la adquisición de las imágenes del par de carriles A.

**Figura 26** Numeración de carriles



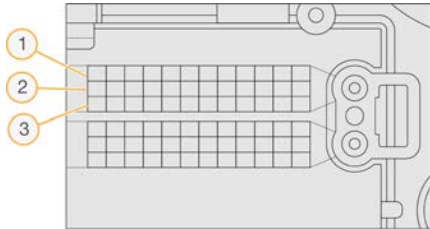
- A Par de carriles A: carriles 1 y 3
- B Par de carriles B: carriles 2 y 4



## Numeración de sectores

Las imágenes de cada carril se adquieren en tres sectores. Los sectores están numerados del 1 al 3 para las celdas de flujo de rendimiento elevado.

Figura 27 Numeración de sectores



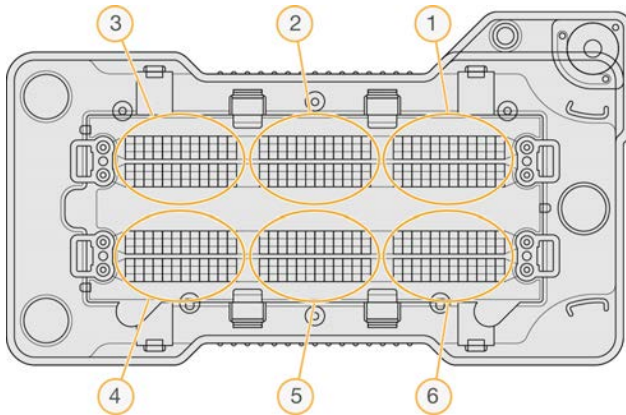
## Numeración de cámaras

NextSeq 500 utiliza seis cámaras para efectuar la adquisición de imágenes de la celda de flujo.

Las cámaras están numeradas del 1 al 6. Las cámaras del 1 al 3 adquieren imágenes del carril uno.

Las cámaras del 4 al 6 adquieren imágenes del carril tres. Después de adquirir imágenes de los carriles 1 y 3, el módulo de adquisición de imágenes se desplaza al eje X para obtener imágenes de los carriles 2 y 4.

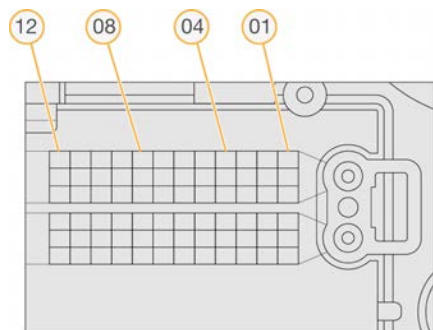
Figura 28 Numeración de cámaras y segmentos (se muestra una celda de flujo de rendimiento elevado)



## Numeración de placas

Hay 12 placas en cada sector de cada segmento de cámara. Las placas están numeradas del 01 al 12, independientemente del número de sector o del segmento de cámara, y se representan con dos dígitos.

**Figura 29** Numeración de placas



El número de placa completo incluye cinco dígitos para la representación de la ubicación, tal y como se indica a continuación:

- ▶ **Superficie:** 1 representa la superficie superior y 2 representa la superficie inferior
- ▶ **Sector:** 1, 2 o 3
- ▶ **Cámara:** 1, 2, 3, 4, 5 o 6
- ▶ **Placa:** 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 o 12

**Ejemplo:** el número de placa 12 508 indica la superficie superior, sector 2, cámara 5 y placa 8.

El número de placa completo de cinco dígitos se usa en el nombre de los archivos de imágenes en miniatura y los archivos empíricos de fases de hebras retrasadas. Para obtener más información, consulte [Archivos de resultados de secuenciación en la página 52](#).

## Asignación de nombre a imágenes en miniatura

Se genera una imagen en miniatura para cada canal de color (rojo y verde) para las placas 1, 6 y 12 de todas las cámaras, superficies superiores e inferiores en cada ciclo durante la adquisición de imágenes. Las imágenes en miniatura se generan en el formato de archivo JPG.

Se asigna a cada imagen un nombre con el número de placa tal y como indica la convención de nomenclatura siguiente, que siempre empieza por **s\_**:

- ▶ **Carril:** 1, 2, 3 o 4
- ▶ **Placa:** número de placa de 5 dígitos que indica la superficie, el sector, la cámara y la placa
- ▶ **Canal:** rojo o verde

**Ejemplo:** `s_3_12512_green.jpg`, que indica el carril 3, la superficie superior, el sector 2, la cámara 5, la placa 12 y el canal verde.

## Estructura de la carpeta de resultados

El software de control genera el nombre de la carpeta de resultados de forma automática.

### 📁 Data (Datos)

#### 📁 Intensities (Intensidades)

##### 📁 BaseCalls (Llamada de bases)

📁 L001: archivos de llamada de bases para el carril 1, agregados en un archivo por ciclo.

📁 L002: archivos de llamada de bases para el carril 2, agregados en un archivo por ciclo.

📁 L003: archivos de llamada de bases para el carril 3, agregados en un archivo por ciclo.

📁 L004: archivos de llamada de bases para el carril 4, agregados en un archivo por ciclo.

📁 L001: un archivo \*.locs agregado para el carril 1.

📁 L002: un archivo \*.locs agregado para el carril 2.

📁 L003: un archivo \*.locs agregado para el carril 3.

📁 L004: un archivo \*.locs agregado para el carril 4.

### 📁 Images (Imágenes)

#### 📁 Focus (Enfoque)

📁 L001: imágenes de enfoque para el carril 1.

📁 L002: imágenes de enfoque para el carril 2.

📁 L003: imágenes de enfoque para el carril 3.

📁 L004: imágenes de enfoque para el carril 4.

📁 InterOp: archivos binarios usados por Sequencing Analysis Viewer (SAV).

📁 Logs (Registros): archivos de registro que describen los pasos operativos.

📁 Recipe (Fórmula): archivo de la fórmula específico del experimento con el nombre del ID del cartucho de reactivos.

📁 RTALogs (Registros de RTA): archivos de registro que describen los pasos del análisis.

📁 Thumbnail\_Images (Miniatura\_Imágenes): imágenes en miniatura para las placas 1, 6 y 12 en cada sector de cada ciclo.

📄 RTAComplete.xml

📄 RTAConfiguration.xml

📄 RunInfo.xml

📄 RunNotes.xml

📄 RunParameters.xml

# Índice alfabético

## A

- actualización del software 33
- administrar instrumento
  - apagado 35
- adquisición de imágenes, secuenciación de dos canales 50
- ajustes de configuración 44
- alertas de estado 4
- algoritmo Phred 51
- análisis
  - archivos de resultados 52
  - opciones 19-20
- análisis, principal
  - pureza de la señal 50
- apagado del instrumento 35
- archivos
  - de resultados 52
- archivos de filtros 52
- archivos de llamadas de bases 52
- archivos de resultados, secuenciación 52
- archivos InterOp 36, 52
- archivos locs 52
- asistencia al cliente 60
- ayuda
  - documentación 1
  - técnica 60

## B

- barra de estado 2
- BaseSpace Sequence Hub 1, 20
  - configuración 45
  - iconos de transferencia 27
  - inicio de sesión 20, 41
- botón de encendido 10
- botón de encendido/apagado 5

## C

- carpeta de resultados 19
- cartucho de reactivos
  - depósito n.º 28 30
  - descripción general 8
  - preparación 16
- cartucho de tampones 9, 23
- celda de flujo
  - adquisición de imágenes 54

- asignación de nombre a archivos de imagen 55
- descripción general 7
- embalaje 17
- limpieza 17
- numeración de carriles 53
- numeración de placas 55
- número de sector 54
- pares de carriles 7
- pasadores de alineación 22
- placas 52
- rehibridación 39
- tipos 1
- ciclos en una lectura 16
- compartimento de adquisición de imágenes 2-3
- compartimento de reactivos 2
- compartimento de tampones 2
- compartimento del filtro de aire 2-3
- compatibilidad
  - seguimiento de RFID 8
- componente de barra de estado 2
- componentes
  - compartimento de adquisición de imágenes 2-3
  - compartimento de reactivos 2
  - compartimento de tampones 2
  - compartimento del filtro de aire 2
- comprobación del sistema 41
- comprobación previa al experimento 25
- configuración del experimento, opción avanzada 12
- consideraciones sobre el indexado 51
- consumibles
  - agua de laboratorio 14
  - cartucho de reactivos 8
  - cartucho de tampones 9
  - celda de flujo 7
  - consumibles de lavado 29-30
  - experimentos de secuenciación 13
  - mantenimiento del instrumento 13
- consumibles suministrados por el usuario 13
- contraseña y nombre de usuario del sistema 10
- creación de un experimento 16
- crear un experimento 16
- criterios de medición
  - ciclos de densidad de grupos 27
  - ciclos de intensidad 27
  - llamada de bases 50
- criterios de medición del experimento 26

## D

documentación 1, 60  
duración del experimento 16

## E

error de almacenamiento en red 44  
errores  
    iconos de estado 4  
    probabilidad 51  
errores de comprobación previa al experimento 37  
experimentos  
    creación 16  
    crear 16

## F

fase de hebra adelantada 49  
fase de hebra retrasada 49  
filtro de aire 32  
filtro de castidad 50  
flujo de trabajo  
    cartucho de reactivos 16, 24  
    cartucho de tampones 23  
    celda de flujo 22  
    comprobación previa al experimento 25  
    consideraciones sobre el indexado 51  
    criterios de medición del experimento 26  
    duración del experimento 16  
    hipoclorito de sodio 30  
    inicio de sesión de BaseSpace Sequence Hub 20, 41  
    Local Run Manager 20  
    modo de Local Run Manager 20  
    modo manual 21  
    NCS 20  
    opción de carga avanzada 12  
    preparación de la celda de flujo 17  
    puerta del compartimento de la celda de flujo 19  
    reactivos usados 22  
    secuenciación 48  
flujo de trabajo de secuenciación 48  
formación en línea 1  
formamida, posición 6 25

## G

generación de plantillas 49  
grupos que superan el filtro 50  
guías para el agua de laboratorio 14

## H

hipoclorito de sodio, lavado 30

## I

iconos  
    errores y advertencias 4  
    estado 4  
    minimización de NCS 5  
imágenes en miniatura 52  
instrumento  
    ajustes de configuración 44  
    botón de encendido/apagado 5  
    puesta en servicio 10  
intensidades 50  
interruptor de encendido 10

## L

lavado  
    automático 28  
    componentes de lavado 29  
    consumibles suministrados por el usuario 29  
    manual 29  
lavado de instrumento 29  
lavado posterior al experimento 28  
llamada de bases 50  
    consideraciones sobre el indexado 51  
Local Run Manager 19-20  
    crear un experimento 16  
    módulos 19  
longitud de lectura 16

## M

mantenimiento  
    prevención 29  
mantenimiento del instrumento  
    consumibles 13  
mensaje de error de RAID 43  
modo de experimento  
    Local Run Manager 20

- manual 20-21
- modo manual
  - creación de un experimento 16
- módulos 19

## N

- nombre de usuario y contraseña del sistema 10
- numeración de cámaras 54
- numeración de carriles 53
- numeración de placas 55
- numeración de sectores 54

## O

- opción de carga avanzada 12

## P

- parámetros de experimento
  - editar parámetros 20
  - modo de Local Run Manager 20
  - modo manual 21
- pares de carriles 53
- prevención, mantenimiento 29
- problemas técnicos, asistencia 60
- puerta del compartimento de la celda de flujo 19
- puntuaciones Q 51
- purgar consumibles 13

## R

- reactivos
  - desecho correcto 24
- reactivos usados
  - contenedor lleno 38
  - desecho 22, 31
- rehibridación del cebador 39
- rehibridación, Lectura 1 39
- RTA v2
  - cierre 47
  - descripción general 47
- RunInfo.xml 36, 52

## S

- secuenciación
  - consumibles suministrados por el usuario 13
- Sequencing Analysis Viewer 15
- servicio de copia universal 27

- Servicio de supervisión Illumina Proactive 12, 46
- software
  - actualización automática 34
  - actualización manual 34
  - ajustes de configuración 44
  - análisis de imágenes, llamadas de bases 3
  - creación de un experimento 16
  - crear un experimento 16
  - duración del experimento 16
  - inicialización 10
  - integrado en el instrumento 3
- software de análisis en tiempo real 1, 3
  - resultados 52
- software de control 3
- solución de problemas
  - archivos específicos del experimento 36
  - comprobación del sistema 1
  - comprobación previa al experimento 37
  - contenedor de reactivos usados 38
  - criterios de medición de baja calidad 39
  - opciones de contacto 36
- superar el filtro (PF) 50

## T

- tablas de calidad 51
- transferencia de datos
  - iconos de actividad 27
  - servicio de copia universal 27

## U

- ubicación de carpeta 21
- ubicación de grupos
  - archivos 52
  - generación de plantillas 49

## W

- Windows
  - acceso 5
  - contraseña 5

# Asistencia técnica

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

Sitio web: [www.illumina.com](http://www.illumina.com)  
Correo electrónico: [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

## Números del servicio de asistencia al cliente de Illumina

Región	Teléfono gratuito	Regional
Norteamérica	+1 800 809 4566	
Alemania	+49 800 101 4940	+49 893 803 5677
Australia	+1 800 775 688	
Austria	+43 800 006 249	+43 1928 6540
Bélgica	+32 8007 7160	+32 3400 2973
China	400 066 5835	
Corea del Sur	+82 802 345 300	
Dinamarca	+45 8082 0183	+45 8987 1156
España	+34 911 899 417	+34 800 300 143
Finlandia	+358 800 918 363	+358 974 790 110
Francia	+33 805 102 193	+33 170 770 446
Hong Kong (China)	800 960 230	
Irlanda	+353 180 093 6608	+353 016 950 506
Italia	+39 800 985 513	+39 236 003 759
Japón	0 800 111 5011	
Noruega	+47 8001 6836	+47 2193 9693
Nueva Zelanda	080 045 1650	
Países Bajos	+31 800 022 2493	+31 207 132 960
Reino Unido	+44 800 012 6019	+44 207 305 7197
Singapur	+1 800 579 2745	
Suecia	+46 850 619 671	+46 200 883 979
Suiza	+41 565 800 000	+41 800 200 442
Taiwán (China)	008 0665 1752	
Otros países	+44 179 953 4000	

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

Documentación del producto: disponible para su descarga de [support.illumina.com](http://support.illumina.com).



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 (EE. UU.)

+ 1 800 809 ILMN (4566)

+ 1 858 202 4566 (fuera de Norteamérica)

[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

[www.illumina.com](http://www.illumina.com)

**Para uso exclusivo en investigación.  
Prohibido su uso en procedimientos de diagnóstico.**

© 2021 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

**illumina**<sup>®</sup>