

# Instrucciones de uso

## Hereditary Plus OncoKitDx

REF IMG-399

Fabricado por:

Instituto de Medicina Genómica SL

Agustín Escardino 9,

Parc Científic de la Universitat de València

46980 Paterna (Valencia, España)

+34 963 212 340 - info@imegen.es



Rev. 5 18/03/2022

Imegen le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de fabricación. Esta garantía se hace extensible hasta la fecha de caducidad, siempre que se observen las condiciones de conservación especificadas en este manual.

**Nuestros productos están diseñados para diagnóstico *in vitro*.** Imegen no le ofrece ninguna otra garantía, expresa o implícita, que se extienda más allá del funcionamiento correcto de los componentes de este kit. La única obligación de Imegen, respecto de las garantías precedentes, será la de reemplazar los productos, o bien devolver el precio de la compra de los mismos, a voluntad del cliente, siempre y cuando se pruebe la existencia de un defecto en los materiales, o bien en la elaboración de sus productos.

Imegen no será responsable de ningún daño, directo o indirecto, que resulte en pérdidas económicas o en daños que pudieran producirse por el uso de este producto por parte del comprador o usuario.

Todos los productos comercializados por Imegen son sometidos a un riguroso control de calidad. **Hereditary Plus OncoKitDx** ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada ensayo.

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con nuestro Departamento Técnico:

**Teléfono:** 963 212 340

**e-mail:** [tech.support@imegen.es](mailto:tech.support@imegen.es)

\***Imegen** es una marca registrada del Instituto de Medicina Genómica en España que forma parte del Grupo Imegen

| <b>Modificaciones de las Instrucciones de Uso (IFU)</b> |  |
|---|--|
| Versión: 05   | Actualización del apartado 7.7   |
| Versión: 04   | Adición de la <i>flag Hotspot</i> en el filtro por defecto                 |
| Versión: 03   | Modificación del contenido   |
| Versión: 02   | Cambio de protocolo del equipo Magnis y ajuste parámetros del secuenciador |

# Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Información general</b>   | <b>4</b>  |
| <b>2. Uso previsto</b>  | <b>6</b>  |
| <b>3. Características técnicas</b>  | <b>8</b>  |
| <b>4. Advertencias y precauciones de seguridad</b>                              | <b>9</b>  |
| <b>5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit</b>                     | <b>10</b> |
| <b>6. Equipos, reactivos y materiales no suministrados</b>                      | <b>13</b> |
| <b>7. Protocolo de ensayo</b>   | <b>15</b> |
| 7.1 Preparación del instrumento Magnis para ejecutar un protocolo               | 15        |
| 7.2 Preparación y fragmentación del ADN molde                                   | 16        |
| 7.3 Preparación de los reactivos y fungible empleado en el sistema Magnis       | 19        |
| 7.4 Ejecución del protocolo de preparación de las librerías                     | 21        |
| 7.5 Limpieza del equipo después de un ensayo                                    | 34        |
| 7.6 Validación y cuantificación de las librerías                                | 35        |
| 7.7 Desnaturalización de las librerías para carga en el equipo Illumina MiSeq   | 37        |
| 7.8 Desnaturalización de las librerías para carga en el equipo Illumina NextSeq | 37        |
| 7.9 Parámetros para el secuenciador   | 38        |
| <b>8. Análisis de los resultados</b>  | <b>39</b> |
| 8.1 Solicitud de análisis   | 39        |
| 8.2 Gestión de solicitudes  | 40        |
| 8.3 Análisis de grandes reordenamientos (CNVs)                                  | 42        |
| 8.4 Análisis de ALUs o grandes inserciones                                      | 44        |
| 8.5 Filtrado de variantes   | 45        |
| <b>9. Troubleshooting</b>   | <b>47</b> |
| <b>10. Limitaciones</b>   | <b>52</b> |
| 10.1 Analíticas   | 52        |
| 10.2 Equipos  | 53        |
| 10.3 Reactivos  | 53        |
| 10.4 Plataforma de análisis bioinformático                                      | 54        |
| 10.5 Estabilidad del producto   | 54        |

# 1. Información general

El término cáncer hace referencia a un grupo muy amplio y variado de enfermedades que se caracterizan todas ellas por un crecimiento descontrolado de determinadas células del cuerpo y que se diseminan a tejidos de otras partes del cuerpo. Las causas que desencadenan la aparición del cáncer son muy variadas y, con frecuencia, son el resultado de la interacción de un número elevado de factores de riesgo. Estos factores de riesgo provocan variaciones en los genes y en el genoma que dan lugar a una pérdida del control de determinados procesos biológicos que provocan un crecimiento celular descontrolado.

El cáncer hereditario se produce cuando una persona nace con una mutación genética que le proporciona una mayor predisposición a desarrollar un determinado tipo de cáncer. Aproximadamente un 5-10% de todos los cánceres son hereditarios. Además, los portadores de variantes patogénicas en genes asociados a un determinado tipo de cáncer tienen un mayor riesgo de desarrollar tumores en otros tejidos distintos al del tumor original. Ese riesgo puede ser mayor o menor en función del gen en el que se haya identificado la mutación.

## Referencias

- González-Santiago S, Ramón Y Cajal T, Aguirre E, Alés-Martínez JE, Andrés R, Balmaña J, Graña B, et al. SEOM clinical guidelines in hereditary breast and ovarian cancer (2019). Clin Transl Oncol. 2020; 22(2):193-200.
- Guillén-Ponce C, Lastra E, Lorenzo-Lorenzo I, Martín Gómez T, Morales Chamorro R, Sánchez-Heras AB, Serrano R, et al. SEOM clinical guideline on hereditary colorectal cancer (2019). Clin Transl Oncol. 2020;22(2):201-212.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Genetic/familial High-risk assessment: Breast, ovarian, and pancreatic [Internet]. United States: NCCN; 2021 [updated 11-08-2021]. Available from: genetics\_bop.pdf (nccn.org)
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Genetic/familial High-risk assessment: Colorectal [Internet]. United States: NCCN; 2021 [updated 11-05-2021]. Available from: genetics\_colon.pdf (nccn.org)

- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Gastric Cancer [Internet]. United States: NCCN; 2021 [updated 03-08-2021]. Available from: [gastric.pdf \(nccn.org\)](#)
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Kidney Cancer [Internet]. United States: NCCN; 2021 [updated 01-07-2021]. Available from: [kidney.pdf \(nccn.org\)](#)
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Melanoma: cutaneous [Internet]. United States: NCCN; 2021 [updated 19-02-2021]. Available from: [cutaneous\\_melanoma.pdf \(nccn.org\)](#)
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Neuroendocrine and adrenal tumors [Internet]. United States: NCCN; 2021 [updated 13-08-2021]. Available from: [neuroendocrine.pdf \(nccn.org\)](#).
- Bono M, Fanale D, Incorvaia L, Cancelliere D, Fiorino A, Calò V, et al. Impact of deleterious variants in other genes beyond BRCA1/2 detected in breast/ovarian and pancreatic cancer patients by NGS-based multi-gene panel testing: looking over the hedge. *ESMO Open*. 2021;6(4):100235.
- Stjepanovic N, Moreira L, Carneiro F, Balaguer F, Cervantes A, Balmaña J, et al. Hereditary gastrointestinal cancers: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019;30(10):1558–1571.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Prostate cancer [Internet]. United States: NCCN; 2021 [updated 17-02-2021]. Available from: [prostate.pdf \(nccn.org\)](#)
- Guilmette J, Nosé V. Hereditary and familial thyroid tumours. *Histopathology*. 2018;72(1):70–81.
- Kamihara J, Bourdeaut F, Foulkes WD, Molenaar JJ, Mossé YP, Nakagawara A, et al. Retinoblastoma and Neuroblastoma Predisposition and Surveillance. *Clin Cancer Res*. 2017;23(13):e98–e106.
- Kalish JM, Doros L, Helman LJ, Hennekam RC, Kuiper RP, Maas SM, et al. Surveillance Recommendations for Children with Overgrowth Syndromes and Predisposition to Wilms Tumors and Hepatoblastoma. *Clin Cancer Res*. 2017;23(13):e115–e122.
- Committee on Gynecologic Practice. ACOG Committee Opinion No. 727: Cascade Testing: Testing Women for Known Hereditary Genetic Mutations Associated With Cancer. *Obstet Gynecol*. 2018;131(1):e31–e34.

## 2. Uso previsto

**Hereditary Plus OncoKitDx** emplea la tecnología de secuenciación masiva de alto rendimiento (NGS) para la detección de variantes de un único nucleótido (SNVs), pequeñas inserciones y deleciones (INDELS), variaciones en el número de copias (CNVs) y la presencia de grandes inserciones, como las inserciones ALU asociadas con cáncer familiar.

**Hereditary Plus OncoKitDx** ha sido diseñado para analizar las secuencias de las regiones codificantes de 101 genes seleccionados para el estudio de la predisposición a padecer alguno de los tipos de cáncer hereditario más frecuentes (mama, ovario, colorrectal, útero, melanoma, renal, próstata, pancreático, neoplasia endocrina múltiple, feocromocitoma, paraganglioma y retinoblastoma).

Los genes incluidos en el panel son los siguientes:

*ABRAXAS1 (FAM175A), ACD, AIP, AKT1, ALK, APC (incl. 5' UTR), ATM, ATR, AXIN2, BAP1, BARD1, BLM, BMPRIA, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDC73, CDH1, CDK4, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CHEK2, CTNNA1, CYLD, DICER1, EPCAM (incl. 3' UTR), FANCC, FANCG, FANCM, FH, FLCN, GALNT12, GALNT14, GDNF, GEN1, GREM1, HABP2, HOXB13, KIF1B, KLLN, LZTR1, MAX, MC1R, MEN1, MET, MITF, MLH1, MLH3, MRE11A, MSH2, MSH3, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, NF2, NTHL1, PALB2, PHOX2B, PIK3CA, PMS2, POLD1, POLE, POT1, PRKARIA, PRSS1, PTCH1, PTEN, RAD50, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RB1, RECQL4, RET, RINT1, SDHA, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, SEC23B, SLX4, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMARCE1, SPRED1, STK11, SUFU, TERF2IP, TERT, TMEM127, TP53, TSC1, TSC2, VHL, WTI y XRCC2.*

Además, se han incluido otras regiones intergénicas de interés para el cálculo de CNVs de los genes *EPCAM* (3' UTR) y *MSH2* (5' UTR), así como 50 regiones intrónicas para cubrir Hotspot descritos en los genes *APC, ATM, ATR, BRCA1, BRCA2, CHEK2, FH, LZTR1, MET, MLH1, MSH2, NF1, PMS2, PTEN, RB1, RET, SDHB, STK11* y *TERT*.

El ensayo se realiza utilizando ADN extraído de sangre periférica o saliva, y la construcción de librerías se lleva a cabo por hibridación y captura de las regiones de interés, posterior secuenciación NGS empleando la tecnología de Illumina y análisis bioinformático a través de la herramienta Data Genomics, ofrecida por Imegen.

Los resultados obtenidos en este ensayo proporcionarán al clínico las variantes de las regiones codificantes de los 101 genes incluidos en el panel. Dicha información determinará la predisposición del paciente a padecer cáncer hereditario.

**Hereditary Plus OncoKitDx** es sólo para uso en diagnóstico in vitro y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.

### 3. Características técnicas

**Hereditary Plus OncoKitDx** ha sido validado en las plataformas MiSeq System y NextSeq System de Illumina mediante el análisis de muestras de ADN de referencia procedentes de Coriell Institute, y muestras de relevancia clínica previamente genotipadas con otras tecnologías. En dicha validación se ha verificado la detección específica de las variantes presentes en los genes seleccionados (ver apartado anterior) así como la repetibilidad y reproducibilidad de la técnica.

El kit permite la detección tanto de SNVs, INDELS, ALUs y CNVs.

Especificidades técnicas:

- Tipo de muestra: ADN procedente de sangre periférica y saliva
- Cantidad de ADN de partida: 50 – 100 ng.
- Cobertura media: >350X.
- Cobertura: 99 % de las bases cubiertas a una profundidad de 20X.
- Uniformidad: 98.8% de las bases cubiertas a >20% de la media de cobertura.
- Especificidad: > 99 %
- Sensibilidad: > 99 %
- Repetibilidad: > 99 %
- Reproducibilidad: > 99 %

**Hereditary Plus OncoKitDx** es compatible con plataformas de secuenciación masiva de Illumina.

Imegen está certificada frente a la norma **UNE-EN ISO 13485:2018 Productos Sanitarios: Sistemas de Gestión de Calidad – Requisitos para fines reglamentarios** por la AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS para el Diseño, desarrollo y producción de productos sanitarios para diagnóstico in vitro:

- Kits de análisis genético
- Software para análisis bioinformático de datos genéticos



## 4. Advertencias y precauciones de seguridad

1. Se recomienda seguir estrictamente las instrucciones de este manual, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento de los reactivos.
2. No pipetear con la boca.
3. No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.
4. Se debe proteger debidamente cualquier afección cutánea, así como cortes, abrasiones y otras lesiones de la piel.
5. No verter los restos de reactivos a la red de agua potable. Se recomienda utilizar los contenedores de residuos establecidos por la normativa legal y gestionar su tratamiento a través de un gestor de residuos autorizado.
6. En caso de un derrame accidental de alguno de los reactivos, evitar el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas y limpiar con abundante agua.
7. Las hojas de datos de seguridad (MSDS) de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición.
8. Este producto requiere la manipulación de muestras y materiales de origen humano. Se recomienda considerar todos los materiales de procedencia humana como potencialmente infecciosos y manipularlos conforme a la norma de la OSHA sobre Bioseguridad de nivel 2 de los patógenos de transmisión sanguínea o se deben utilizar otras prácticas pertinentes de bioseguridad para los materiales que contienen o se sospecha que puedan contener agentes infecciosos.
9. Los reactivos incluidos en este kit no son tóxicos, explosivos, infecciosos, radiactivos, magnéticos, corrosivos ni causantes de contaminación ambiental biológica.
10. Este kit ha sido validado con unos equipos y en unas condiciones específicas que podrían variar sensiblemente en otros laboratorios. Se recomienda por tanto que cada laboratorio realice una validación interna cuando vaya a utilizar por primera vez el kit.
11. El fabricante no responde del mal funcionamiento del ensayo cuando los reactivos incluidos en el kit son sustituidos por otros reactivos no suministrados por Imegen.
12. El fabricante no garantiza la reproducibilidad del ensayo cuando el usuario introduce reactivos no validados por Imegen, por considerarlos equivalentes a los suministrados en el kit.
13. El fabricante no se hace responsable de los resultados obtenidos cuando el análisis bioinformático se realiza en una plataforma de análisis distinta a Data Genomics.

## 5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

Este kit contiene reactivos suficientes para la preparación de 48 librerías. La relación de reactivos incluidos en el kit es la siguiente:

- Fragmentation Buffer: Tampón necesario para la fragmentación del ADN, previa a la preparación de librerías de NGS.
- Fragmentation Enzyme: Enzima requerida para la fragmentación del ADN y preparación del ADN para la ligación de los adaptadores.
- Elution Buffer: Tampón para eluir el ADN.
- Reagents Plate: Placa con todos los reactivos necesarios para llevar a cabo las reacciones de reparación de los extremos de los fragmentos de ADN, ligación de los adaptadores de Illumina, y amplificaciones llevadas a cabo durante el protocolo de preparación de librerías.
- Beads and Buffers plate: Placa con las partículas magnéticas y los tampones de lavado necesarios para llevar a cabo la captura y las purificaciones necesarias durante el protocolo de preparación de librerías.
- Index strip: Oligonucleótidos con una secuencia única de 8 nucleótidos compatible con los adaptadores de Illumina. Son necesarios para marcar las librerías de cada muestra dando lugar a una combinación única, que permitirá su análisis tras la secuenciación. El kit incluye 48 index distribuidos en tiras de un solo uso.
- Hereditary Probes Strips: Oligonucleótidos sintéticos biotinilados complementarios a las regiones diana del kit, que permiten la hibridación con dichas zonas y posteriormente son capturadas mediante partículas magnéticas de estreptavidina, debido a la propiedad biológica de unión entre las moléculas biotina-estreptavidina.
- Sample Input Strips: Tiras de 8 pocillos vacías en las que se colocará el ADN de las muestras.
- Magnis Library Output Strips, QC Strips, and Foil Seals: Tiras de 8 pocillos para la recogida de las librerías generadas, tiras para la recogida de las librerías precaptura, con las que se podría hacer un control de calidad opcional, y sellos para las tiras de pocillos incluidas en

el kit.

- Magnis 96-Well PCR Plate: Placa en la que tendrán lugar las reacciones de amplificación.
- Magnis Deep-Well HSM Plate: Placa en la que se llevará a cabo la captura y las purificaciones necesarias en el protocolo de preparación de librerías.
- Magnis Thermal Cycler Seal: Sello para placa de 96 pocillos.
- Magnis Tip Waste Bin: Contenedor para el desecho de las puntas empleadas durante el protocolo.

A continuación, se muestran listados los componentes del kit:

| Caja 1 de 7             |                   |          |              |
|-------------------------|-------------------|----------|--------------|
| Reactivos               | Color del soporte | Cantidad | Conservación |
| Sample input strips     | Rojo              | 3 tiras  | 15-25°C      |
| Beads and buffer plates | Blanco            | 3 placas | 4°C          |
| Elution Buffer          | Disco Verde       | 3 x 1 mL | 4°C          |

Tabla 1. Reactivos de la caja 1 de Hereditary Plus OncoKitDx

| Caja 2 de 7             |                   |          |              |
|-------------------------|-------------------|----------|--------------|
| Reactivos               | Color del soporte | Cantidad | Conservación |
| Sample input strips     | Rojo              | 3 tiras  | 15-25°C      |
| Beads and buffer plates | Blanco            | 3 placas | 4°C          |

Tabla 2. Reactivos de la caja 2 de Hereditary Plus OncoKitDx

| Caja 3 de 7          |                   |          |              |
|----------------------|-------------------|----------|--------------|
| Reactivos            | Color del soporte | Cantidad | Conservación |
| Fragmentation Buffer | Tapón Verde       | 96 µL    | -20°C        |
| Fragmentation Enzyme | Tapón Blanco      | 48 µL    | -20°C        |
| Reagents Plate       | Blanco/Negro      | 3 placas | -20°C        |
| Index strip*         | Negro             | 3 tiras  | -20°C        |

Tabla 3. Reactivos de la caja 3 de Hereditary Plus OncoKitDx

| Caja 4 de 7    |                   |          |              |
|----------------|-------------------|----------|--------------|
| Reactivos      | Color del soporte | Cantidad | Conservación |
| Reagents Plate | Blanco/Negro      | 3 placas | -20°C        |
| Index strip*   | Negro             | 3 tiras  | -20°C        |

Tabla 4. Reactivos de la caja 4 de Hereditary Plus OncoKitDx

Nota: Cada kit incluirá 6 tiras con las cuatro posibles combinaciones de Index: A1, A2, A3 y A4.

| Caja 5 de 7              |                   |          |              |
|--------------------------|-------------------|----------|--------------|
| Reactivos                | Color del soporte | Cantidad | Conservación |
| Hereditary Probes strips | Blanco            | 3 tiras  | -80°C        |

Tabla 5. Reactivos de la caja 5 de Hereditary Plus OncoKitDx

| Caja 6 de 7              |                   |          |              |
|--------------------------|-------------------|----------|--------------|
| Reactivos                | Color del soporte | Cantidad | Conservación |
| Hereditary Probes strips | Blanco            | 3 tiras  | -80°C        |

Tabla 6. Reactivos de la caja 6 de Hereditary Plus OncoKitDx

| Caja "Magnis Empty Consumables"; Caja 7 de 7 |                   |          |              |
|--|-------------------|----------|--------------|
| Reactivos                                    | Color del soporte | Cantidad | Conservación |
| Magnis Library Output Strips                 | Verde             | 1 tira   | 15-25°C      |
| QC Strips                                    | Azul              | 1 tira   | 15-25°C      |
| Foil Seals                                   | -                 | 5        | 15-25°C      |
| Magnis 96-Well PCR Plate                     | Azul              | 1 placa  | 15-25°C      |
| Magnis Deep-Well HSM Plate                   | Blanco            | 1 placa  | 15-25°C      |
| Magnis Thermal Cycler Seal                   | -                 | 1        | 15-25°C      |

Tabla 7. Reactivos de la caja "Magnis Empty Consumables"; Caja 4 de 4

NOTA: El kit contiene 6 cajas "Magnis Empty Consumables" con fungible necesario para la realización de 6 runs con el equipo Magnis.

## 6. Equipos, reactivos y materiales no suministrados

### Equipos:

- Termociclador con tapa con temperatura regulable
- Micropipetas de 10 µL, 20 µL, 200 µL y 1000 µL
- Vortex (Compatible con tubos de 1.5 mL; con velocidad regulable de 300 a 3000 rpm)
- Centrífuga (Compatible con tubos de 1.5 mL y tiras de 0.2mL; con velocidad regulable de al menos 1000 rpm)
- Centrífuga de placas
- Fluorímetro (Recomendado: Qubit; ThermoFisher)
- Analizador de fragmentos (Opcional: TapeStation System de Agilent Technologies; LabChip GX Touch/GXII Touch de PerkinElmer)
- Equipo automatizado de preparación de librerías Magnis NGS Prep System, de Agilent Technologies (cat. no. G9710AA)
- Secuenciador de Illumina (Recomendados: MiSeq y NextSeq)

### Reactivos:

- Kit de extracción (Recomendado: QIAamp DNA Investigator Kit; cat. no. 56504; Qiagen)
- Agua libre de nucleasas
- Reactivos del fluorímetro. Recomendado: Qubit dsDNA BR Assay kit (cat. no. Q32853; Invitrogen), Qubit dsDNA HS Assay kit (cat. no. Q32854; Invitrogen).
- NaOH 0.2N (cat.no. 1091401000; Fluka)
- TRIS-HCl 200 mM pH 7
- PhiX Control v3 (cat. no. FC-110-3001; Illumina)
- Reactivos del analizador de fragmentos. Opcional:
  - TapeStation D1000 Reagents (cat. no. 5067-5583; Agilent), High Sensitivity D1000 Reagents (cat. no. 5067-5585; Agilent)

- DNA High Sensitivity Reagent Kit (cat. no. CLS760672; PerkinElmer)

Nota: Este kit no incluye los reactivos necesarios para llevar a cabo la secuenciación por NGS.

#### **Materiales:**

- Puntas de pipetas con filtro (10 µL, 20 µL, 200 µL y 1000 µL)
- Puntas estériles con filtro compatibles con Magnis NGS Prep System (Ref: 19477-022; Agilent)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Tubos o tiras estériles de 0.2 mL
- Guantes de látex
- Material fungible del fluorímetro. Recomendado: Qubit™ assay tubes (Ref: Q32856; Invitrogen)
- Material fungible del analizador de fragmentos. Opcional:
  - TapeStation D1000 ScreenTape (cat. no. 5067-5582; Agilent), High Sensitivity D1000 ScreenTape (cat. no. 5067-5584; Agilent)
  - DNA 1K/ 12K/ Hi Sensitivity Assay LabChip (cat. no. 760517; PerkinElmer)

#### **NOTA**

**Hereditary Plus OncoKitDx** está preparado para usarse en combinación con los kits **imegen-Sample tracking components (REF: IMG-340)**, que permiten el seguimiento de cada muestra desde la dilución del ADN hasta el análisis bioinformático de los resultados mediante un sistema integrado de identificación de muestras. De este modo, se puede asegurar la trazabilidad de las muestras durante todo el protocolo. Estas referencias se encuentran

## 7. Protocolo de ensayo

Los reactivos incluidos en **Hereditary Plus OncoKitDx**, que serán usados por el equipo automatizado Magnis NGS Prep System, se ofrecen pre-dispensados para la realización de las 48 librerías a lo largo de 6 ensayos de 8 librerías cada uno, optimizando así el uso del equipo.

A continuación, se detallan los pasos necesarios para llevar a cabo la preparación de 8 librerías mediante el uso de **Hereditary Plus OncoKitDx**.

### 7.1 Preparación del instrumento Magnis para ejecutar un protocolo

1. Verificar que no haya ningún material de ensayos anteriores sobre la unidad del instrumento, ya que podría interferir en los procesos de puesta en marcha y configuración del instrumento.
2. Cerrar la puerta del instrumento.
3. Encender el instrumento, presionando el botón de encendido en la parte frontal del dispositivo (se iluminarán los indicadores LED del instrumento). Esperar mientras el sistema realiza una serie de actividades de puesta en marcha, que pueden durar varios minutos.
4. Antes de cada ensayo se recomienda realizar una descontaminación UV, para ello:
  - En la pantalla *Home*, pulsar *Decontamination*.

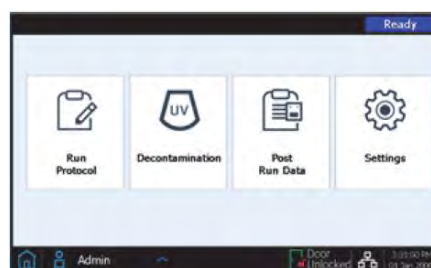


Figura 1. Pantalla *Home* del sistema *Magnis NGS Prep*

- En la pantalla *Decontamination*, presionar *Quick cycle*, seguido de *Start* (los indicadores LED se apagarán durante la descontaminación UV, para dar paso a la emisión UV).

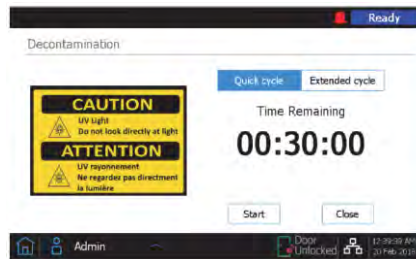


Figura 2. Pantalla *Decontamination* del sistema *Magnis NGS Prep*

**Advertencia:** No mirar directamente a la luz UV mientras esté activo el proceso de descontaminación.

**Nota:** Durante los 30 minutos que dura el proceso de descontaminación, prosiga con el protocolo.

5. Una vez completado el ciclo de descontaminación (emisión azul de los indicadores LED del instrumento), pulsar *Close* para volver a la pantalla *Home*.

## 7.2 Preparación y fragmentación del ADN molde

A continuación, se detallarán los pasos a seguir para la preparación y fragmentación de 8 muestras, mediante el uso de **Hereditary Plus OncoKitDx**.

Todos los reactivos y fungible de preparación, dilución y fragmentación del ADN, deben almacenarse y utilizarse en áreas separadas de aquellas donde se lleven a cabo procedimientos de reacción en cadena de la polimerasa.

### 7.2.1 Cuantificación y dilución de las muestras de ADN

1. Descongelar a temperatura ambiente las muestras de ADN.
2. Agitar y cuantificar las muestras de ADN con un equipo fluorométrico, como Qubit.
3. Diluir cada muestra de ADN a 30 ng/ $\mu$ L con agua libre de nucleasas en un volumen final de 25  $\mu$ L.

**Opcional:** Si se va a utilizar el sistema integrado de trazabilidad de Imegen (Sample tracking components; Ref. IMG-340), realizar este paso, sustituyendo 2.5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, por la misma cantidad de un único reactivo de seguimiento por cada muestra.



4. Agitar en vortex y cuantificar de nuevo cada muestra con un equipo fluorométrico, como Qubit.
5. Diluir cada muestra de ADN con agua libre de nucleasas a la cantidad de 100 ng totales, en un volumen final de 7  $\mu$ L, en tira de pocillos de 0.2 mL.

En caso de no disponer de 100 ng totales en un volumen de 7  $\mu$ L:

- Bajar la concentración total a 50 ng totales. Si se elige esta opción se debe llevar a cabo para las 8 muestras del run.

6. Agitar todas las diluciones en vortex, dar un spin y mantener en frío hasta su uso en el siguiente apartado.

## 7.2.2 Fragmentación del ADN

En este apartado, el ADN se fragmentará enzimáticamente, con el objetivo de obtener fragmentos de ADN de un tamaño entre 200 y 250 pb.

Reactivos a utilizar en este apartado:

| Reactivo             | Color        | Conservación |
|----------------------|--------------|--------------|
| Fragmentation Buffer | Tapón verde  | -20°C        |
| Fragmentation Enzyme | Tapón blanco | -20°C        |
| Sample Input Strip   | Tira roja    | 15 – 25°C    |

1. Descongelar y mantener en frío el reactivo *Fragmentation Buffer*. Mantener a -20°C el reactivo *Fragmentation Enzyme* hasta su uso.
2. Preparar el volumen apropiado del mix de fragmentación en frío, tal y como se describe a continuación, agitando cada reactivo antes de su uso. El reactivo *Fragmentation Buffer* debe agitarse vigorosamente en vortex, mientras que el reactivo *Fragmentation Enzyme* se agita varias veces por inversión. En el procesado de varias muestras, recomendamos preparar las mezclas de reactivos con un exceso del 12%.

| Reactivo             | Volumen por reacción | Volumen (8 muestras) |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| Fragmentation Buffer | 2 µL                 | 18 µL                |
| Fragmentation Enzyme | 1 µL                 | 9 µL                 |

3. Agitar vigorosamente en vortex.
4. Dispensar 3 µL del mix de fragmentación a cada pocillo de 0.2 mL con la muestra fragmentada. Mezclar pipeteando 20 veces.
5. Sellar la tira, dar un spin a las muestras, inmediatamente después colocar los tubos en el termociclador y ejecutar el programa de fragmentación.

- Tapa pre-calentada a 100 °C.
- Volumen de reacción 10 µL.

| Temperatura | Tiempo     | Ciclos |
|-------------|------------|--------|
| 37°C        | 10 minutos | 1      |
| 65°C        | 5 minutos  | 1      |
| 4°C         | ∞          |        |

Tabla 8. Programa de fragmentación óptimo

**Nota:** Este protocolo, requiere que la tapa esté pre-calentada a 100 °C. En termocicladores con rampas rápidas como el usado durante la validación de este protocolo, GeneAmp PCR System 9700 (ThermoFisher), no es necesario pre-calentar la tapa. Si este no es su caso, pre-caliente la tapa unos minutos antes de comenzar con el protocolo.

6. Cuando acabe el programa de fragmentación, extraer las muestras del termociclador, dar un spin, añadir 40 µL de agua libre de nucleasas a cada muestra, transferir todo el volumen a una *Sample Input Strip*, sellar con los sellos de aluminio incluidos, y mantener en frío hasta su uso en el siguiente apartado.

**Nota:** En el equipo *Magnis NGS Prep System* la muestra se debe situar como se observa en la Figura 3, con la Muestra 1 cargada en el pocillo más alejado del código de barras.

**Nota:** No agregue ningún texto o etiqueta que pueda oscurecer el código de barras de la *Sample Input Strip*.



Figura 3. Orientación requerida de las muestras en la *Sample Input Strip*.

### 7.3 Preparación de los reactivos y materiales plásticos usados en el sistema Magnis

Reactivos a utilizar en este apartado:

| Reactivo                       | Color        | Conservación |
|--------------------------------|--------------|--------------|
| Reagents Plate                 | Placa Azul   | -20°C        |
| Beads and Buffer Plate         | Placa Blanca | 4°C          |
| Index Strip                    | Tira Negra   | -20°C        |
| Hereditary Probe Strip         | Tira Blanca  | -80°C        |
| Box "Magnis Empty Consumables" | N/A          | 15 – 25°C    |

#### 1. Preparación del reactivo *Reagents plate*:

- Descongelar a temperatura ambiente la placa, manteniendo su embalaje de cartón blanco.
- Una vez descongelado el contenido de todos los pocillos, agitar en vortex la placa sosteniendo la placa con su embalaje de cartón, comenzar presionando sobre el lado largo de la placa contra el cabezal del vortex, durante 10 segundos. Posteriormente, girar la placa 90° y presionar el lado corto de la placa contra el cabezal del vortex otros 10 segundos. Continuar la secuencia de rotación y agitación en los cuatro lados de la placa.
- Centrifugar la placa envuelta en cartón a 250 x g durante 1 minuto.
- Comprobar que no haya burbujas al fondo de los pocillos de la placa. Si hubiera, repetir la centrifugación.

- Conservar la placa, manteniendo su embalaje, en frío para su uso el mismo día.

## 2. Preparación del reactivo *Beads and Buffer plate*:

- Atemperar durante al menos 30 minutos antes de su uso, manteniendo su embalaje de cartón blanco.
- Agitar en vortex la placa sosteniendo la placa con su embalaje de cartón. Comenzar presionando sobre el lado largo de la placa contra el cabezal del vortex, durante 10 segundos. Posteriormente, girar la placa 90° y presionar el lado corto de la placa contra el cabezal del vortex otros 10 segundos. Continuar la secuencia de rotación y agitación en los cuatro lados de la placa.
- Centrifugar la placa envuelta en cartón a 150 x g durante 10 segundos. No exceder la velocidad y duración de centrifugado recomendadas, para evitar que se sedimenten las partículas magnéticas.
- Mantener la placa, manteniendo su embalaje, a temperatura ambiente para su uso el mismo día.

## 3. Preparación de la *Index strip*:

- Determinar y registrar el conjunto de *index* que se utilizará en el ensayo. Las tiras suministradas tienen grabado en el extremo opuesto al *barcode*, la combinación que incluyen, A1, A2, A3 o A4. En la siguiente tabla se puede observar el orden de los *index* en cada tira, y su secuencia.

| A1 Strip |           | A2 Strip |           | A3 Strip |           | A4 Strip |           |
|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|
| Index    | Secuencia | Index    | Secuencia | Index    | Secuencia | Index    | Secuencia |
| A01      | GTCTGTCA  | A02      | GCGAGTAA  | A03      | AGCAGGAA  | A04      | CCGTGAGA  |
| B01      | TGAAGAGA  | B02      | GTCGTAGA  | B03      | AGCCATGC  | B04      | GACTAGTA  |
| C01      | TTCACGCA  | C02      | GTGTTCTA  | C03      | TGGCTTCA  | C04      | GATAGACA  |
| D01      | AACGTGAT  | D02      | TATCAGCA  | D03      | CATCAAGT  | D04      | GCTCGGTA  |
| E01      | ACCACTGT  | E02      | TGGAACAA  | E03      | CTAAGGTC  | E04      | GGTGCGAA  |
| F01      | ACCTCCAA  | F02      | TGGTGGTA  | F03      | AGTGGTCA  | F04      | AACAACCA  |
| G01      | ATTGAGGA  | G02      | ACTATGCA  | G03      | AGATCGCA  | G04      | CGGATTGC  |
| H01      | ACACAGAA  | H02      | CCTAATCC  | H03      | ATCCTGTA  | H04      | AGTCACTA  |

Tabla 9. Secuencias de los index incluidos en el kit

- Descongelar en frío la *Index strip* seleccionada, agitar 5 segundos en vortex y dar un spin.
- Revisar los pocillos de la tira para verificar que el líquido se acumula en el fondo de los pocillos y que no haya burbujas.

**IMPORTANTE:** En caso de no registrar la tira de *index* empleada para un ensayo, esta puede ser revisada a través del equipo *Magnis Prep System* en la pantalla *Post-Run Data*. Una vez en esta pantalla, abrir la pestaña *Labware Info* y buscar la fila *Index Strip*. El número de la tira, se informa como un valor de 1 a 12 en la parte derecha de la pantalla, en la columna *Index Strip*. Los *Index* específicos asociados con cada número de 1 a 12 se muestran en la siguiente tabla.

| Nº de <i>Index Strip</i> de la pantalla <i>Post-Run Data</i> | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 |
|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Inscripción de la <i>Index Strip</i>                         | A1 | A2 | A3 | A4 | A1 | A2 | A3 | A4 | A1 | A2 | A3 | A4 |

Tabla 10. Correlación de los *Index* entre la pantalla *Post-Run Data* y la inscripción en la tira

4. Inmediatamente antes de su uso, descongelar en frío la *Hereditary Probe Strip*. Agitar 5 segundos en vortex y dar un spin. Es importante revisar que no se hayan formado burbujas en el fondo del pocillo.

**Nota:** La sonda se encuentra pre-dispensada en el primer pocillo de la tira, la cual no incluye etiquetas legibles que muestren la identidad específica del diseño de la sonda. Se recomienda tener especial cuidado para garantizar la trazabilidad de este reactivo tanto en el almacenaje como durante el protocolo.

5. Por último, preparar una caja de *Magnis Empty Consumables* para utilizarla durante la configuración de la unidad.

## 7.4 Ejecución del protocolo de preparación de las librerías

### 7.4.1 Inicio del protocolo

1. En la pantalla *Home* de la pantalla táctil, pulsar *Run Protocol*. El sistema bloqueará la puerta del instrumento y realizará un *Instrument Health Check* (IHC), que puede durar varios minutos.
2. Una vez acabado el chequeo aparecerá directamente la pantalla *Enter Run Info*

(introducir la información del ensayo). En el menú *Protocol*, seleccionar *SSEL XTHS-RevB-ILM*.

3. Recomendado: Marcar la casilla de verificación *Aliquot sample for QC* para que el equipo recoja una alícuota de cada librería pre-captura, y poder analizar su control de calidad posteriormente.

Nota: El control de calidad de las librerías pre-captura sólo estará disponible cuando el ensayo completo haya finalizado.

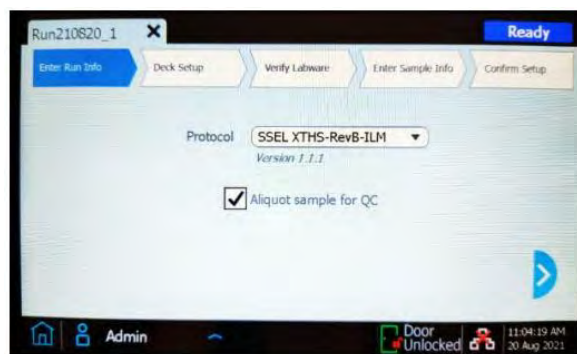


Figura 4. Pantalla *Enter Run Info* del sistema *Magnis NGS Prep*

4. Avanzar a la siguiente pantalla.
5. Seleccionar el tipo de muestra apropiado, *High Quality DNA*.
6. Seleccionar la cantidad de ADN de partida en el menú *Input Amount*. Aunque aparecen las opciones 10 ng, 50 ng, 100 ng y 200 ng, para la preparación de librerías mediante el uso de **Hereditary Plus OncoKitDx**, se recomienda la cantidad de 100 ng. Cambiar la cantidad de ADN en caso de haber partido de otra cantidad (mínima de 50 ng).

Nota: Los ajustes de calidad y cantidad de ADN molde determinarán el número de ciclos en las posteriores amplificaciones que llevará a cabo el equipo. Por lo que es importante introducir esta información adecuadamente, así como que todas las muestras tengan idéntica cantidad de ADN de entrada.

#### 7.4.2 Configuración de la unidad

La configuración de la unidad puede llevarse a cabo fácilmente a través de los pasos indicados en la pantalla táctil de Magnis.

Para cada paso de carga de la unidad, la posición que debe cargarse aparecerá sombreada

en azul en la pantalla táctil. Una vez completado cada paso, avanzar a la siguiente pantalla.

Para garantizar la correcta colocación de los reactivos y material fungible en la unidad Magnis, comprobar que el *barcode* de cada elemento está orientado hacia el usuario, es decir hacia la parte delantera del instrumento. Con excepción de *Magnis Thermal Cyclers Seal*, cuyo *barcode* va orientado hacia arriba y las 3 cajas de puntas necesarias y no incluidas en el kit, que no llevan *barcode*.

Es importante que, tras retirar la tapa de las cajas de puntas nuevas y completamente llenas, se verifique que las cajas estén bien fijadas en la plataforma.

La siguiente figura muestra una unidad totalmente cargada, numerándose cada material del 1 al 10, siguiendo los pasos que solicita el equipo Magnis. Como puede observarse las dos placas de reactivos, así como las cinco tiras necesarias, deben introducirse en el equipo selladas.



Figura 5. Unidad del instrumento *Magnis NGS Prep* cargada para el ensayo y guía rápida de carga.

A continuación, se detallan los pasos de configuración que se indican en la pantalla táctil de Magnis:

1. Colocar el recipiente desechable *Magnis Tip Waste Bin* (incluido en la caja "*Magnis Empty Consumables*") en el cajón de desechos situado en la esquina inferior izquierda. El *barcode* debe quedar orientado hacia el usuario, como se muestra en la pantalla táctil. Cerrar el cajón de desechos.

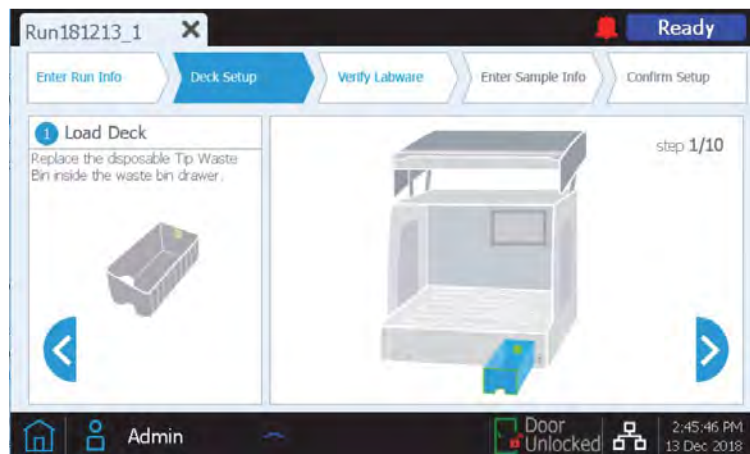


Figura 6. Paso 1 de 10 de la pantalla *Deck Setup* del equipo Magnis NGS Prep

2. Colocar la *Magnis Deep-Well HSM Plate* (incluida en la caja "*Magnis Empty Consumables*") tal y como muestra la pantalla táctil del equipo. Para ello, primero se debe insertar el borde izquierdo de la placa en la ranura con resorte y, a continuación, bajar el borde derecho de la placa hasta que se alinee con la plataforma. Una vez alineada, mover la placa ligeramente hacia la derecha, y asegurarse de que queda bien fija dentro del soporte.



Figura 7. Paso 2 de 10 de la pantalla *Deck Setup* del equipo Magnis NGS Prep



3. Colocar el *Magnis Thermal Cyclers Seal* (incluido en la caja "*Magnis Empty Consumables*") tal y como muestra la pantalla táctil del equipo. Para ello, retirar la película protectora de la almohadilla blanca situada bajo la placa de metal. Después de retirar toda la lámina de película, insertar el *Thermal Cyclers Seal* en la ranura del termociclador, con el *barcode* hacia arriba, y deslizar hasta que se encaje en su lugar.

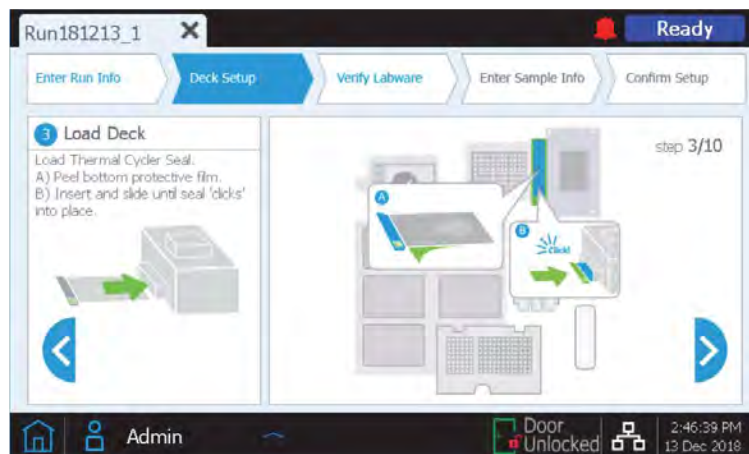


Figura 8. Paso 3 de 10 de la pantalla *Deck Setup* del equipo Magnis NGS Prep

4. Colocar la *Magnis 96-Well PCR Plate* (incluida en la caja "*Magnis Empty Consumables*") tal y como muestra la pantalla táctil del equipo. Para ello, inserte los pocillos de la placa en los pocillos del bloque del termociclador, con el *barcode* de la placa orientado hacia el usuario. Asegurar la fijación de la placa presionando uniformemente primero en el centro de la placa y posteriormente en las esquinas de la placa.

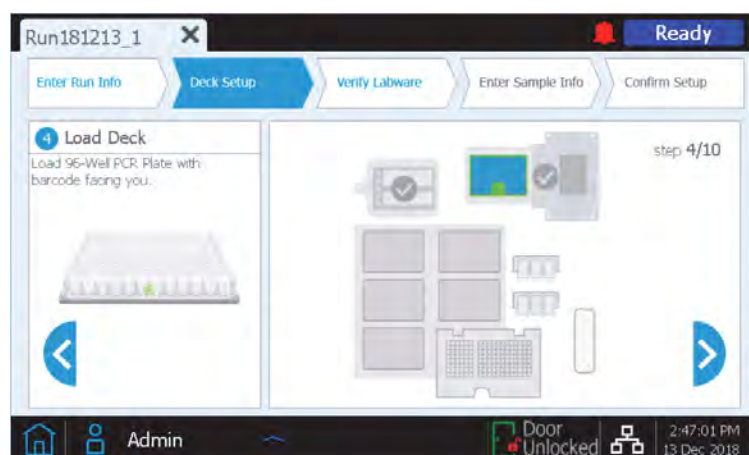


Figura 9. Paso 4 de 10 de la pantalla *Deck Setup* del equipo Magnis NGS Prep

5. Cargar una caja de puntas nueva y llena en cada una de las posiciones de la unidad indicadas en la pantalla táctil del equipo (tres cajas en total). Después de retirar la tapa, verificar que cada caja de puntas queda bien fija a su plataforma.



Figura 10. Paso 5 de 10 de la pantalla *Deck Setup* del equipo Magnis NGS Prep

6. Colocar la *Beads and Buffer Plate* (preparada en el apartado 7.3 de este documento). Retirar la caja de cartón blanca y, a continuación, colocar la placa tal y como se muestra en la pantalla táctil del equipo, con el *barcode* orientado hacia el usuario. Para ello, primero se debe insertar el borde izquierdo de la placa en la ranura con resorte, a continuación, bajar el borde derecho de la placa hasta que se alinee con la plataforma. Una vez alineada, mover la placa ligeramente hacia la derecha, y asegurarse de que queda bien fija dentro del soporte.



Figura 11. Paso 6 de 10 de la pantalla *Deck Setup* del equipo Magnis NGS Prep

7. Antes de proseguir con la carga del equipo Magnis, el módulo de enfriamiento del instrumento debe alcanzar la temperatura de 12°C. Si no se ha alcanzado dicha temperatura al llegar a este paso, la pantalla táctil aparecerá como se muestra en la Figura 12. Sin embargo, si el enfriador ya ha alcanzado la temperatura necesaria no aparecerá esta pantalla.

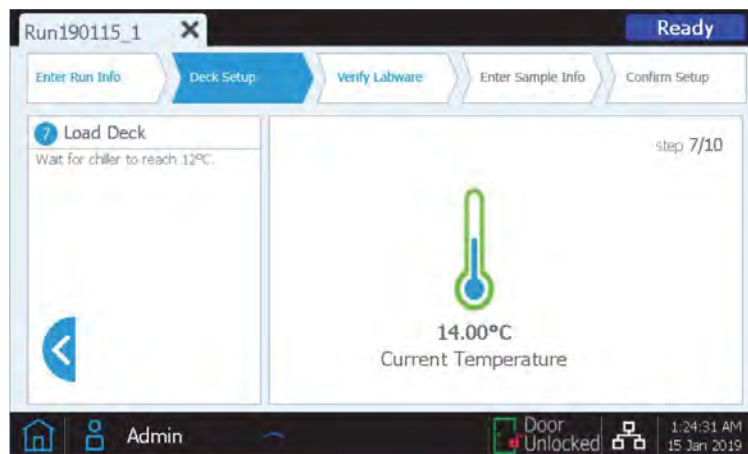


Figura 12. Paso 7 de 10 de la pantalla *Deck Setup* del equipo Magnis NGS Prep

8. Abrir la puerta del módulo enfriador, pulsando el botón de medio círculo indicado con una flecha verde en la pantalla táctil. Colocar la *Reagent Plate* (preparada en el apartado 7.3 de este documento) en el módulo de enfriamiento. Retirar la caja de cartón blanca y, a continuación, cargar la placa tal y como se muestra en la pantalla táctil del equipo, con el *barcode* orientado hacia el usuario. Presionar firmemente hacia abajo, aplicando presión uniformemente a lo largo de la placa.

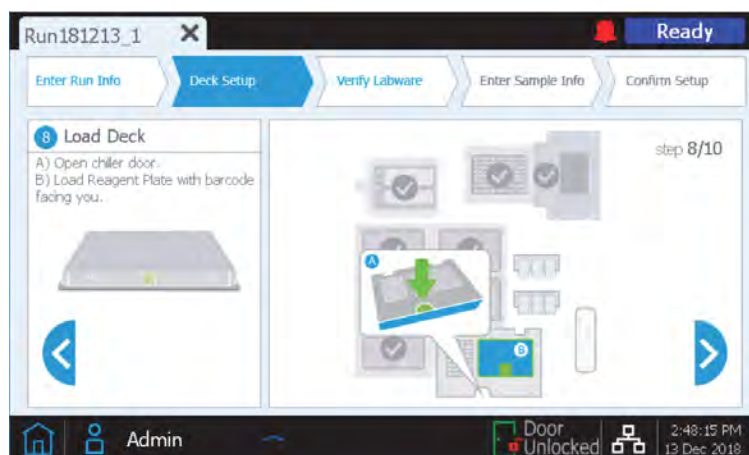


Figura 13. Paso 8 de 10 de la pantalla *Deck Setup* del equipo Magnis NGS Prep

9. Cargar las tiras de tubos para el ensayo en las posiciones indicadas del enfriador como se muestra en la pantalla táctil del equipo. Fijar cada tira presionado firme y uniformemente sobre los bordes de la tira de tubos. Evitar tocar o dañar los sellos de aluminio. Todas las tiras de tubos deben tener el *barcode* orientado hacia el usuario.
- Cargar la *Sample Input Strip* (tira roja), con las muestras de ADN preparadas en el apartado 7.2 de este documento, en la posición **S** del soporte de frío del equipo.
  - Cargar la *Index Strip* (tira negra), preparada en el apartado 7.3 de este documento, en la posición **IDX** del soporte de frío del equipo.
  - Cargar la *Hereditary Probe Strip* (tira blanca), preparada en el apartado 7.3 de este documento, en la posición **P** del soporte de frío del equipo.
  - Cargar la *Magnis Library Output Strip* (tira verde), incluida en la caja "*Magnis Empty Consumables*", en la posición **L** del soporte de frío del equipo.
  - Opcional: Si el ensayo incluirá una recolección de alícuotas de las librerías pre-captura para su control de calidad, como recomienda Imegen, cargar la *QC Strip* (tira azul), incluida en la caja "*Magnis Empty Consumables*", en la posición **Q** del soporte de frío del equipo.

Una vez cargadas todas las tiras, cerrar la puerta del enfriador.



Figura 14. Paso 9 de 10 de la pantalla *Deck Setup* del equipo Magnis NGS Prep

10. Cerrar la puerta del instrumento.



Figura 15. Paso 10 de 10 de la pantalla *Deck Setup* del equipo Magnis NGS Prep

### 7.4.3 Verificación del material de laboratorio

Una vez concluida la carga del equipo, se realiza la fase *Verify Labware*, en la que el equipo escanea el *barcode* de cada uno de los componentes presentes en la unidad.

Antes de iniciar la verificación automatizada, se debe comprobar que se hayan retirado las tapas de todas las cajas de puntas y que todas estén llenas, tal y como indica la siguiente figura. Una vez se haya verificado, presionar OK para iniciar la verificación del material.

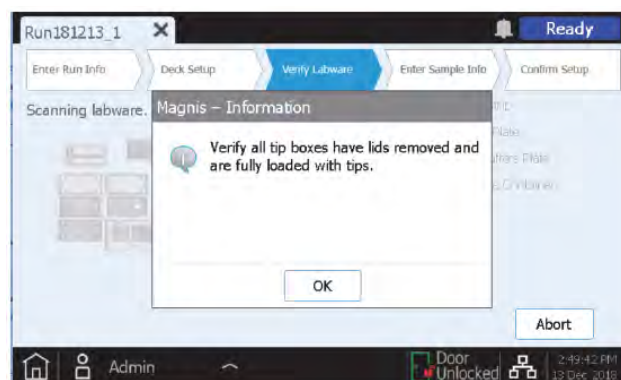


Figura 16. Ventana emergente de la pantalla *Verify Labware* del equipo Magnis NGS Prep

Durante la verificación del material, el instrumento verificará que todos los componentes necesarios para el ensayo están presentes, en la posición y orientación correctas, así como que no hayan excedido su caducidad.

Los resultados de la verificación se mostrarán en la pantalla táctil de Magnis, si todo es correcto (Figura 17), avanzar a la siguiente pantalla, en caso contrario consulte el apartado 9 de este documento.



Figura 17. Pantalla *Verify Labware* del equipo Magnis NGS Prep, tras una verificación correcta del material

La pantalla final de *Verify Labware* permite revisar los detalles de la sonda. Avanzar a la siguiente pantalla.

#### 7.4.4 Asignación de la información de la muestra

El *software* Magnis asigna automáticamente un *Sample ID* predeterminado para la posición de cada muestra, que pueden ser remplazados con un nombre de muestra elegido por el usuario siguiendo cualquiera de los dos métodos que se indican:

##### 1. Asignación manual de las muestras:

- En la pantalla *Enter Sample Info*, seleccionar una posición concreta de la muestra en la pantalla táctil.
- Utilizar la herramienta *Edit Sample ID* para introducir el texto deseado.
- Pulsar *Change* para guardar el texto introducido para la posición de muestra seleccionada.

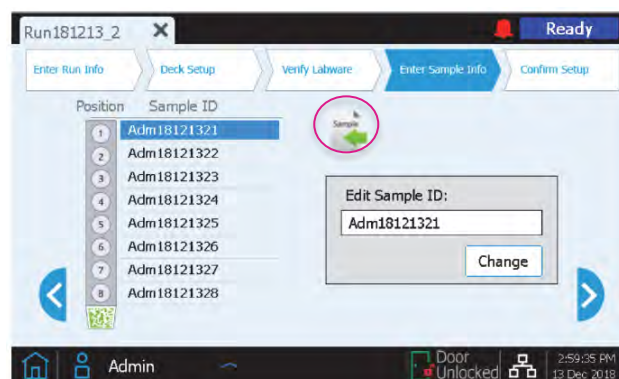
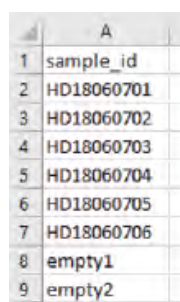


Figura 18. Pantalla *Edit Sample Info* del equipo Magnis NGS Prep, destacando con una circunferencia el botón de carga de muestras.



## 2. Importación de asignaciones de muestras utilizando un archivo.csv:

- Crear un archivo.csv (valor separado por comas) que contenga los nombres de las muestras ordenadas. Para la introducción del nombre de la muestra puede usarse el *software* Microsoft Excel, y posteriormente guardarse en formato .csv.
- Introducir el texto de cabecera `sample_id` en la celda A1, como muestra la Figura 19.



|   | A          |
|---|------------|
| 1 | sample_id  |
| 2 | HD18060701 |
| 3 | HD18060702 |
| 4 | HD18060703 |
| 5 | HD18060704 |
| 6 | HD18060705 |
| 7 | HD18060706 |
| 8 | empty1     |
| 9 | empty2     |

Figura 19. Ejemplo de contenido de archivo.csv (mostrado en formato de hoja de cálculo) para cargar asignaciones de muestras.

- Introducir el nombre de cada muestra desde la celda A2 a la A9. El archivo de entrada de la muestra debe contener 8 ID de muestra únicos. Si se va a llevar a cabo el protocolo con menos de 8 muestras, debe rellenar esas posiciones en el archivo, como muestra la Figura 19 (*empty1* y *empty2*).
- Guardar el archivo en formato .csv.
- Descargar el archivo .csv en un disco USB no cifrado, e introducir dicho USB en uno de los puertos del equipo Magnis.
- Al configurar el ensayo, en la pantalla *Enter Sample Info*, pulsar el botón de carga de muestras (destacado con una circunferencia en la Figura 18).
- Seguir las instrucciones del asistente de configuración del protocolo para transferir los ID de las muestras desde el disco USB.

### 7.4.5 Confirmación de la configuración e inicio del ensayo

1. Verificar las características generales del ensayo. Una vez se confirme que todo es correcto presionar la flecha hacia adelante para pasar a la pantalla de configuración final.
2. Verificar los detalles del ensayo relacionados con las características de la muestra de



ADN. Tras confirmar que los detalles de la configuración son correctos, pulsar el botón *Start* para comenzar el ensayo.

**Importante:** Los números de ciclos de las PCRs pre y post captura han sido fijados en función de la calidad y cantidad de ADN. Variarlos afectaría a la sensibilidad, especificidad y LOD de **Hereditary Plus OncoKitDx**.

Una vez se inicie el ensayo, el indicador LED se iluminará en color verde y la pantalla táctil mostrará el estado del ensayo, así como una estimación del tiempo restante antes de que finalice el ensayo.

El protocolo *SSEL XTHS-RevB-ILM* dura 9 horas aproximadamente, y puede funcionar *overnight* para mayor comodidad. Una vez finalizado el protocolo, las librerías preparadas se conservarán automáticamente a 12 °C. Recoger las librerías del instrumento en un plazo máximo de 24 horas.

Si es necesario, el ensayo se puede abortar pulsando el cuadrado rojo de *Stop* de la pantalla *Running*. Se abrirá un mensaje de advertencia que le pide confirmar que desea abortar el ensayo. Una vez se detiene un ensayo, no se puede reanudar, y el material de laboratorio utilizado en él no se puede volver a cargar para un ensayo posterior.

La pantalla *Running* debe permanecer abierta durante todo el ensayo y el botón de cierre de pantalla (x) y otros botones de navegación estarán inactivos mientras el ensayo esté en curso. No se puede utilizar la pantalla táctil para realizar otras funciones durante un ensayo.

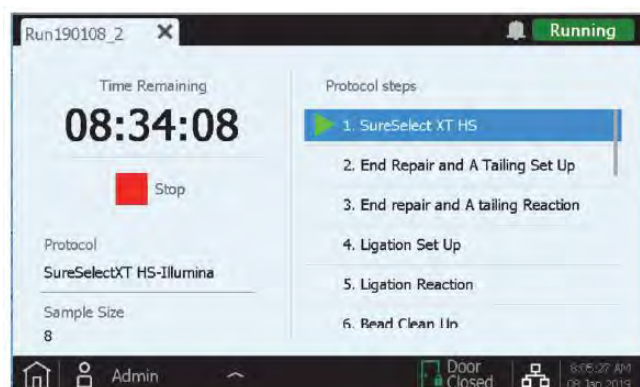


Figura 20. Pantalla *Running* durante un ensayo



#### 7.4.6 Recogida de librerías del equipo

Una vez finalizado el ensayo, la pantalla táctil se muestra como aparece en la siguiente figura. Pulsando *OK*, el equipo transfiere las librerías desde el termociclador, donde se han mantenido desde la finalización del protocolo a la *Library Output Strip* verde, situada en el módulo de enfriamiento.

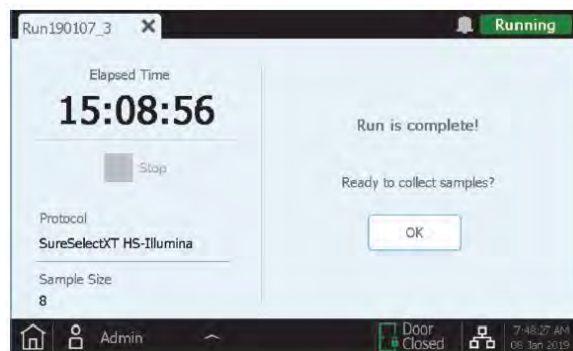


Figura 21. Pantalla *Running* tras un ensayo

Antes de abrir la puerta del equipo, esperar a que los indicadores LED se pongan azules, indicador de que todos los pasos de procesamiento de la muestra mediada por el equipo, han acabado.

El módulo de enfriamiento se mantendrá a 12°C durante un máximo de 2 horas desde que las librerías son colocadas en la *Library Output Strip* verde, siempre y cuando la puerta del equipo se mantenga cerrada.

Abrir la puerta del equipo (hasta que el indicador LED se ilumine de color blanco), recoger y sellar las librerías de la *Library Output Strip* verde.

Es posible detener el protocolo en este punto conservando las librerías a 4°C si van a ser usadas en las próximas 12 horas o a -20°C para almacenamientos más prolongados.

Si se recolectaron las muestras opcionales para el control de calidad de las bibliotecas pre-captura del ensayo, retirar la *QC Strip* azul del módulo de enfriamiento y dejar secar a temperatura ambiente sin sellar si se va a continuar con el protocolo en las próximas 24 horas, o selladas para almacenamientos más prolongados.

Una vez abierta la puerta para la recolección de las librerías, la pantalla táctil del equipo

aparecerá como se muestra a continuación.

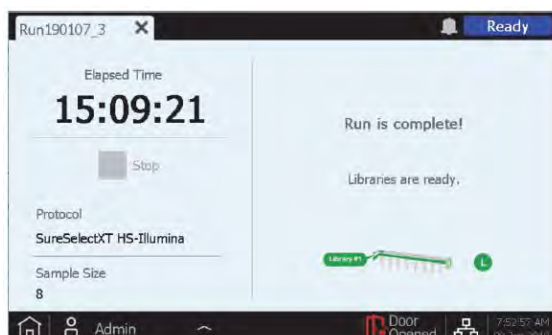


Figura 22. Pantalla *Running* tras un ensayo y con las librerías ya recogidas

Para cerrar la pantalla del ensayo y volver a la pantalla *Home*, pulsar X en la pestaña. Este paso puede llevar varios segundos.

## 7.5 Limpieza del equipo después de un ensayo

Retirar y desechar todos los consumibles usados que queden en la unidad del instrumento:

- El recipiente desechable con las puntas usadas a lo largo del ensayo.
- La *Magnis Deep-Well HSM*.
- La *Magnis Thermal Cyclers Seal*.
- La *Magnis 96-Well PCR Plate*.
- Todas las cajas de puntas, incluidas las parcialmente llenas.
- La *Beads and Buffer Plate*.
- La *Reagent Plate*.
- Las tiras rojas, negras y blancas empleadas durante el ensayo.

Si se observan derrames o fugas de materiales en la unidad del instrumento, se recomienda seguir el procedimiento de descontaminación UV de *Extended Cycle*. Limpiar el derrame siguiendo las instrucciones proporcionadas en la Guía del usuario del instrumento.

## 7.6 Validación y cuantificación de las librerías

### 7.6.1 Control de calidad opcional de la librería pre-captura

Si se requiere el análisis de las librerías pre-captura, resuspender las librerías secas en 6  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas para obtener una concentración adecuada para el análisis, mediante el uso recomendado de TapeStation 2200 y los kits comerciales D1000 Reagents (cat. no. 5067-5583) y D1000 ScreenTape (cat. no. 5067-5582) de Agilent Technologies.

Tras la adición de los 6  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Por último, agitar vigorosamente en vortex para asegurar la resuspensión completa.

Tras el análisis de las muestras con TapeStation se debe obtener un tamaño de la librería entre 300–400 pb (Figura 23). En caso de obtener un tamaño no esperado revise el protocolo o póngase en contacto con el soporte técnico de Imegen.

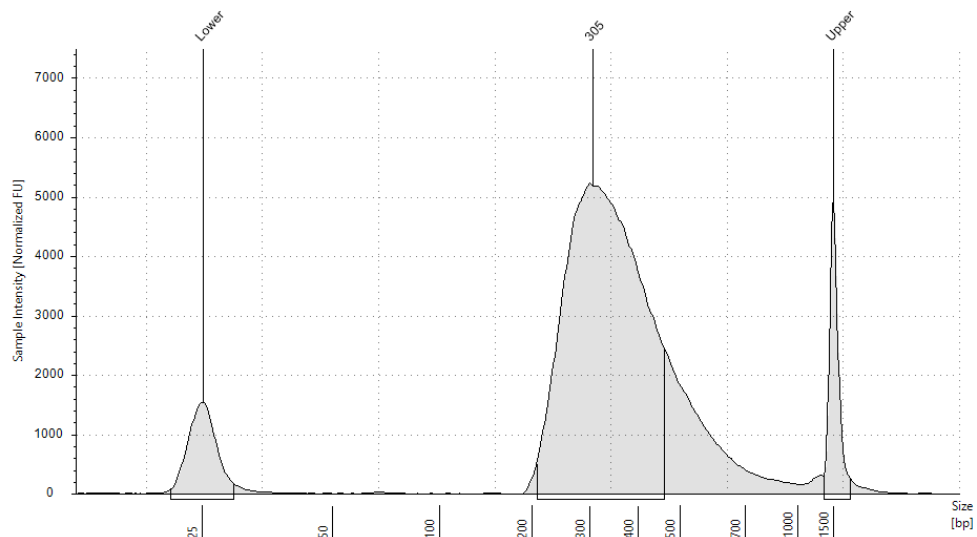


Figura 23. Resultado esperado tras el análisis de tamaño de las librerías pre-captura con TapeStation 2200

Para determinar la concentración de ADN, se deberá integrar el área del pico correspondiente con el tamaño de librería esperado. La cantidad de ADN de librería obtenido variará en función de la concentración del ADN de partida, variando de 30 a 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . El rendimiento general de la librería pre-captura puede calcularse como la cantidad de ADN en 1  $\mu\text{L}$  de la muestra del control de calidad reconstituida x 36 (este valor incluye los ajustes de dilución).

## 7.6.2 Control de calidad opcional de la librería post-captura

Antes de agrupar las librerías para la secuenciación multiplexada, es necesario analizar la cantidad y calidad de cada una de ellas.

Para medir la concentración del ADN, se recomienda el uso de un fluorímetro Qubit<sup>®</sup> 2.0, el kit comercial Qubit ds DNA HS Assay kit (cat. no. Q32854) y los tubos Qubit<sup>™</sup> assay tubes (cat. no. Q32856) de Invitrogen.

La concentración de las librerías post-captura oscilará entre 10 y 20 ng/μL.

Para el análisis de calidad de los fragmentos capturados, Imegen recomienda el uso de TapeStation 2200 y los kits comerciales High Sensitivity D1000 Reagents (cat. no. 5067-5585) y High Sensitivity D1000 ScreenTape (cat. no. 5067-5584) de Agilent Technologies.

El tamaño medio esperado de los fragmentos se sitúa entre 300 y 450 pb. En caso de obtener un tamaño no esperado, revise el protocolo, así como el análisis de calidad de las librerías pre-captura, lea detenidamente el apartado 9 o póngase en contacto con el soporte técnico de Imegen.

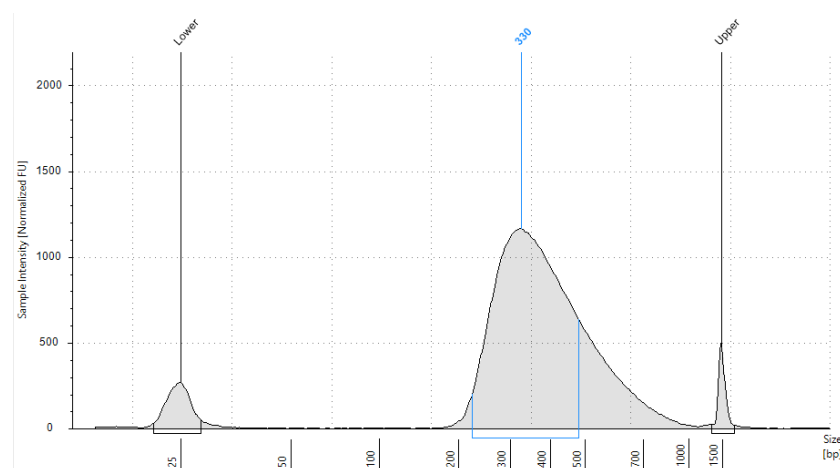


Figura 24. Resultado esperado tras el análisis de tamaño de las librerías post-captura con TapeStation 2200

Con los datos de concentración del ADN y tamaño medio de los fragmentos capturados de las librerías se obtiene la concentración de estas, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración librerías (nM)} = \left[ \text{Concentración (ng/}\mu\text{L)} \cdot \frac{1500}{\text{Tamaño (pb)}} \right]$$

Por último, diluir cada librería a 4 nM con el reactivo *Elution Buffer* y hacer un *pool* equimolar de todas las librerías que se vayan a incluir en un *run*.

Es posible detener el protocolo en este punto conservando las librerías a 4°C si van a ser usadas en las próximas 12 horas o a -20°C para almacenamientos más prolongados.

## 7.7 Desnaturalización de las librerías para carga en el equipo Illumina MiSeq

1. Descongelar el reactivo HT1 (incluido en el kit de reactivos de Illumina con el que se vaya a llevar a cabo la secuenciación; por ejemplo: MiSeq Reagents Kit v2 (300 ciclos). Ref: MS-103-1001) y mantener en frío hasta su uso.
2. Descongelar *PhiX control* y mantener en frío hasta su uso. El *PhiX control* debe estar desnaturalizado y diluido a 12.5 pM (seguir el protocolo de desnaturalización de PhiX Control v3, proporcionado junto con los reactivos de Illumina).
3. Diluir el pool de librerías a 2 nM, añadiendo a un nuevo tubo de 1.5 mL, 10 µL del pool de librerías y 10 µL del reactivo *Elution Buffer*.
4. Añadir 5 µL del pool de librerías a un tubo de 1.5 mL diluido previamente a 2 nM, a un tubo de 1.5 mL y 5 µL de NaOH 0.2N. Agitar en vortex y dar un spin.
5. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Añadir 990 µL de HT1 y agitar en Vortex.
7. A este mix, añadir 10 µL de PhiX control desnaturalizado y diluido a 12.5 pM. En este momento las librerías estarán a 10 pM.
8. Cargar todo el volumen que contiene el tubo de 1,5 mL en el orificio de carga de la muestra en el cartucho.

En la siguiente tabla se especifica el número de muestras máximo recomendado por run para garantizar un número mínimo de clusters PF de aproximadamente 1.25 millones por muestra:

| MiSeq Reagents Kit                      | Nº máximo de muestras |
|---|-----------------------|
| MiSeq V2 (300 cycles). Ref: MS-102-2002 | 16                    |

Tabla 11. Kit de MiSeq Illumina y número máximo de muestras a analizar con Hereditary Plus OncoKitDx

## 7.8 Desnaturalización de las librerías para carga en el equipo Illumina NextSeq

1. Descongelar el reactivo HT1 (incluido en el kit de reactivos de Illumina con el que se vaya a llevar a cabo la secuenciación) y mantener en frío hasta su uso.
2. Descongelar *PhiX control* y mantener en frío hasta su uso. El *PhiX control* debe estar desnaturalizado y diluído a 20 pM.

Nota: Para la desnaturalización de *PhiX control* se debe seguir este mismo protocolo de desnaturalización de librerías.

3. Añadir 5 µL del pool de librerías, diluido previamente a 4 nM, a un tubo de 1.5 mL y 5 µL de NaOH 0.2N. Agitar en vortex y dar un spin.
4. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Añadir 5 µL de Tris-HCl 200 mM pH 7. Agitar en vortex y dar un spin.
6. Añadir 985 µL de HT1 y agitar en vortex. En este momento la librería está a 20 pM.
7. Transferir 78 µL de la librería a 20 pM a un tubo nuevo de 1.5 mL.
8. Añadir 1222 µL de HT1.
9. A esta mezcla, añadir 1.2 µL de *PhiX control* desnaturalizado y diluído a 20 pM. En este momento la librería quedará diluida a 1.2 pM.
10. Cargar todo el volumen que contiene el tubo de 1.5 mL en el cartucho.

En la siguiente tabla se especifica el número de muestras máximo recomendado por run para garantizar un número mínimo de clusters PF de aproximadamente 1.25 millones por muestra.

| NextSeq Reagents Kit  | Nº máximo de muestras |
|---|-----------------------|
| NextSeq 500/550 Mid Output v2.5 kit (300 cycles). Ref: 20024904 | 32                    |

Tabla 12. Kit de NextSeq Illumina y número máximo de muestras a analizar con Hereditary Plus OncoKitDx

## 7.9 Parámetros para el secuenciador

- *Read Type: Paired End.*
- *Cycles: Read 1: 150*  
*Read 2: 150*  
*Index 1 (i7): 8*

## 8 Análisis de los resultados

El análisis bioinformático de los resultados se realiza mediante una *pipeline* de análisis diseñada especialmente para **Hereditary Plus OncoKitDx**, a través de la plataforma Data Genomics. El acceso a esta herramienta se realiza a través de: [www.datagenomics.es](http://www.datagenomics.es).

La herramienta permite llevar a cabo el análisis de las diferentes muestras y obtener todos los ficheros generados tras el análisis bioinformático de las mismas.

Ya que la tecnología NGS todavía no se considera la técnica *Gold Standard* para algunos tipos de mutación, se recomienda, siempre que sea posible, confirmar los resultados positivos mediante una tecnología complementaria y estandarizada.

### 8.1 Solicitud de análisis

1. Seleccionar "*Import Samples*" en la pantalla principal (pestaña de *Orders*) para iniciar el análisis de las muestras secuenciadas. De esta forma se accede a la pantalla de importación de ficheros (Figura 25). En dicha pantalla se deben importar los 2 ficheros FastQ asociados a cada muestra y opcionalmente, el fichero de la *SampleSheet*, que permitiría importar todos los ficheros del mismo run de secuenciación simultáneamente.

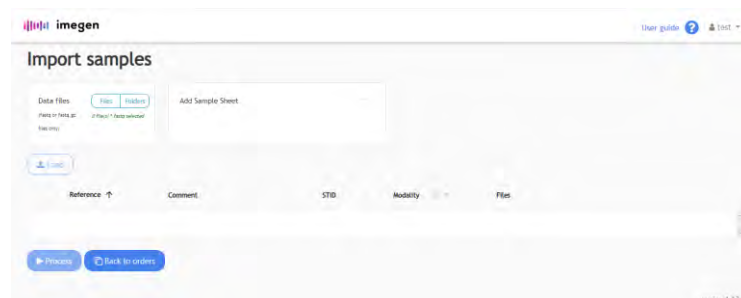



Figura 25. Pantalla para importar los ficheros FastQ y la *SampleSheet* e iniciar la solicitud de análisis.

2. Una vez cargados los ficheros, se deberá indicar el nombre del run de secuenciación y seleccionar la modalidad de estudio, *Hereditary OncoKitDx V2*, y el STID (*Sample Tracking ID*) usado en cada muestra (o "*no stid*", en caso de no haber usado ninguno).
3. Antes de procesar los ficheros de secuenciación es necesario rellenar el tipo de tumor

de cada muestra. Para acceder a la pantalla emergente en la que se encuentra disponible este campo, accionar el icono del lápiz  Además del campo obligatorio, aparecen otros que pueden ser útiles para el usuario (Figura 26). Una vez rellenado seleccionar "Accept".

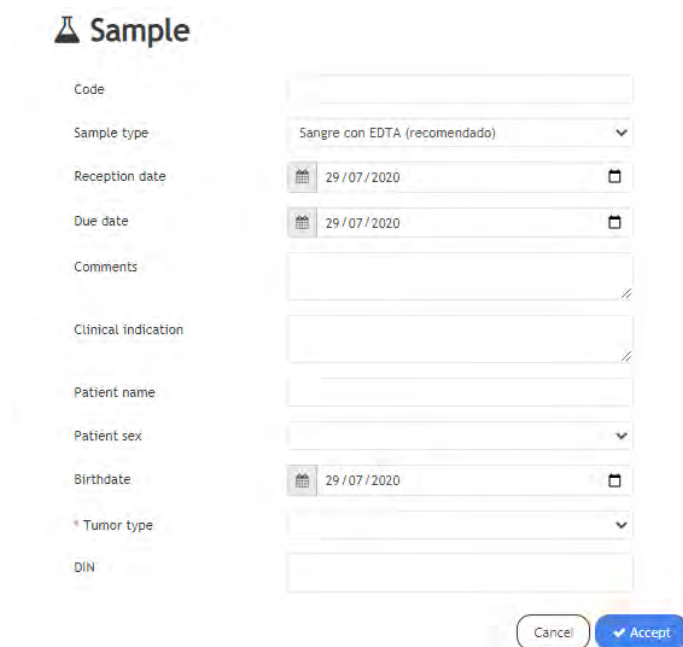


Figura 26. Pantalla emergente con campos obligatorios para cada muestra.

Para llevar a cabo la solicitud de análisis, seleccionar las muestras que se quieran analizar y accionar el botón de "Process". Cuando haya finalizado el proceso con éxito aparecerá el mensaje: ✓ La importación se ha realizado correctamente.

4. Seleccionar "Back to orders" para regresar a la pantalla principal.

## 8.2 Gestión de solicitudes

Todas las solicitudes creadas aparecerán en la pestaña de *Orders* dentro del correspondiente apartado según el estado en el que se encuentran (*In bioinformatic process*, *Pending*, *In review*, *Finished*, *Cancelled*). En la solicitud se mostrará el nombre de la muestra, la modalidad y el estado del análisis.


Pulsando sobre la muestra se accede a una pantalla en la que se pueden anotar y guardar determinadas características de cada muestra, como fechas de recepción, indicación clínica, etc.



Para acceder a los resultados del análisis bioinformático, en la petición *bioinformatics* y seleccionando *"Show results"*, se abrirá la ventana *"Workspace"*. Esta pantalla pone a disposición del usuario los ficheros resultantes del análisis bioinformático: el análisis de regiones ALU e informe correspondiente, los ficheros de alineamiento (bam y bai) y listado de variantes (vcf), así como otros ficheros con información sobre coberturas y el informe de calidad de la secuenciación tras el análisis bioinformático. En la petición *"CNV"*, seleccionando *"Show results"* se puede acceder a los ficheros resultantes del análisis de CNVs por gen (*\_calls.tsv*, *images\_cnv.zip* y *\_sample\_QC.tsv*).

Los parámetros tenidos en cuenta en los diferentes archivos generados de la secuenciación para que una muestra pase el control de calidad bioinformático establecido para el ensayo de **Hereditary Plus OncoKitDx** son:

- FASTQ: Los criterios establecidos de aceptación se encuentran detallados en las instrucciones de uso de *Data Genomics*, disponibles en: [www.datagenomics.es](http://www.datagenomics.es).
- BAMs:
  - On-target (%):
    - Fail:  $\leq 53$
    - Warn: 53–60
    - Pass:  $\geq 60$
  - DP20 (%)
    - Fail:  $\leq 96$
    - Warn: 96 – 98
    - Pass:  $\geq 98$
- STIDs: Comprobación de que el reactivo de trazabilidad obtenido coincida con el esperado (en caso de haber sido usado), como se muestra en la figura 27.

En caso de no superar alguno de los parámetros mencionados, aparecerá en la pantalla principal, junto a la muestra en cuestión, el icono .

En el ensayo **Hereditary Plus OncoKitDx** no se tiene en cuenta para el control de calidad los archivos VCF, ya que se trata de un panel demasiado pequeño como para ser representativo y constante.

| Feature | Obtained | Expected | Status |
|---------|----------|----------|--------|
| STID    | 1011     | 1011     | PASS   |
| Gender  | Mujer    | Mujer    | PASS   |

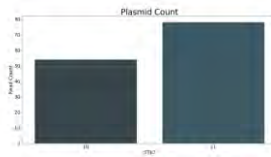


Figura 27. Control de calidad del sistema integrado de trazabilidad.

Para acceder al filtrado de variantes, en la petición "*Filtering*" se aplicarán, opcionalmente, los filtros *Hereditary Plus OncoKitDx d20* o *Hereditary Plus OncoKitDx d50*, cuya única diferencia es la profundidad a la que se llaman los GAPs, por debajo de 20 ó 50 reads. El filtro se caracteriza por:

- Genes del panel
- Variantes de calidad: **PASS; d20; pseudogenic homology; Hotspot\*** (*Fault summary*).
- Profundidad:  $\geq 20X$  (*Clean total count*).
- Frecuencia alélica:  $\geq 30\%$  (*Variant Freq*).
- Distancia al exón: **10** (*Exon distance*).

\* Nota: Las variantes intrónicas *Hotspots* podrán observarse con este filtro a pesar de estar a más de 10 pb del exón.

### 8.3 Análisis de grandes reordenamientos (CNVs)

El análisis de grandes reordenamientos o CNVs a partir de datos de secuenciación NGS, consiste en una correlación entre el número de lecturas normalizadas de una región con respecto al número de copias de ADN para dicha región.

Dado que el número de lecturas debe ser normalizado entre diferentes muestras, la variabilidad entre muestras empeorará la identificación de las CNVs y, por tanto, es muy importante homogenizar en la medida de lo posible las condiciones experimentales entre diferentes muestras y entre diferentes regiones genómicas de una misma muestra. Para reducir la variabilidad y asegurar un correcto análisis de las CNVs se aconseja seguir las siguientes recomendaciones:

1. Es necesario que las condiciones de preparación de librerías y del proceso de captura

sean homogéneas y para ello los diferentes pasos se deben llevar a cabo de manera simultánea con las muestras del mismo ensayo de secuenciación, utilizando de forma simultánea los mismos equipos y siguiendo las indicaciones especificadas en el apartado 7 de este documento.

2. El ADN de partida es otra fuente de variabilidad. Por tanto, se aconseja que todos los ADN's analizados hayan sido extraídos siguiendo los mismos protocolos de extracción.

**Hereditary Plus OncoKitDx**, ofrece un análisis de CNVs que puedan afectar a uno o varios exones de un gen o a un gen completo incluido en el panel (CNVs per gene).

Para analizar los resultados de CNVs con *Data Genomics*, se accederá a los resultados de la petición "*Filtering*" y en concreto a la pestaña CNVs.

*Data Genomics* integra un sistema de alertas para avisar al usuario acerca de la fiabilidad de los resultados en base a los parámetros de calidad de la muestra. De acuerdo a estos parámetros los resultados se considerarán fiables (*High confidence*), de credibilidad intermedia (*Medium confidence*) o de baja credibilidad (*Low confidence*). Los parámetros tenidos en cuenta son los siguientes: similitud con las muestras de la referencia, z-score y ratio, cobertura media, número de muestras de la referencia que se seleccionan para el análisis, uniformidad entre las muestras de la misma tanda y número de CNVs detectadas antes del filtrado de variantes.

Respecto al resultado de CNVs, se mostrarán por defecto las variantes PASS. Estas serán las variantes de buena calidad, que tengan un p-valor  $\leq 0.005$  y una ratio  $\leq 0.7$  o  $\geq 1.3$ . En los filtros el usuario podrá elegir la opción de mostrar variantes No Pass.

Si el análisis de CNVs no se ha podido llevar a cabo aparecerá una alerta en *Data Genomics* indicando el motivo.

*Data Genomics* ofrece una representación gráfica dinámica (Figura 28) de los perfiles de cobertura de la muestra frente a las muestras de la referencia o de la misma tanda para todos los genes y NMs de cada gen. Este gráfico permite ampliar las zonas de interés y visualizar los SNPs e INDELS así como las regiones de conflicto de homología con pseudogenes (área naranja).

En caso de hallar algún resultado positivo, o una calidad de la muestra subóptima, se recomienda confirmar dicho resultado empleando una técnica alternativa como MLPA o dPCR.

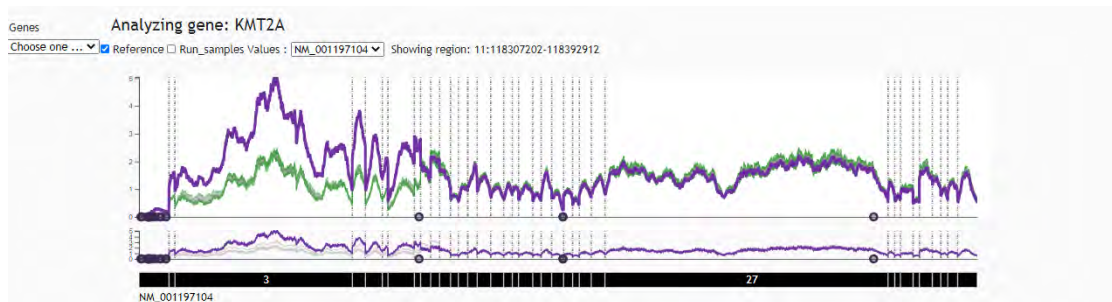


Figura 28. Gráfico dinámico ofrecido en los resultados del análisis de CNVs

## 8.4 Análisis de ALUs o grandes inserciones

La metodología para detectar este tipo de variantes se basa en la identificación de caídas o subidas bruscas de la cobertura a lo largo del perfil de coberturas del panel. Por tanto, es posible que se reporten eventos debidos a una variación en el número de copias (CNVs) que a su vez serán reportados en el análisis de CNVs.

Para analizar los resultados de ALUs, se accederá a los resultados de la petición "Filtering" y en concreto a la pestaña ALUs. Se mostrarán por defecto los eventos PASS, de buena calidad, aunque a través del filtro, el usuario podrá elegir mostrar todos los eventos.

Los eventos calificados como PASS, serán todos aquellos con una frecuencia superior al 7%, y más de 2 lecturas tanto sense como antisense, con la única excepción de las ALUs conocidas en *BRCA2*, c.5007insALU (13:32968896) y c.156\_157insALU (13:32893302), que por su alto valor diagnóstico y su conocida prevalencia en determinadas poblaciones, se les ha otorgado un criterio de aceptación más permisivo, siendo llamadas PASS siempre que tengan una frecuencia superior al 3% y más de 2 lecturas tanto sense como antisense.

Imegen ofrece un informe del análisis de grandes inserciones, en el que aparecerán los eventos PASS. Este informe puede descargarse desde el apartado de descargas. Un ejemplo de la información que se ofrecerá sobre el análisis de estas variantes aparece en la siguiente tabla.

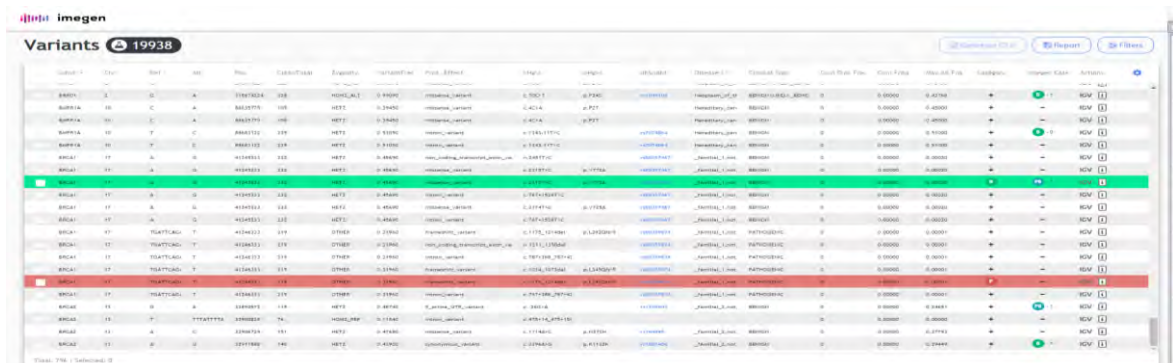
| CHR | POSITION | GENE NAME | ALLELE DEPTH | TOTAL DEPTH | ALLELE FRACTION |
|-----|----------|-----------|--------------|-------------|-----------------|
| 13  | 32893302 | BRCA2     | 19           | 174         | 0.11            |

Tabla 13. Resultados del análisis de grandes inserciones

Nota: Estas regiones, interfieren en la eficiencia del proceso de captura, por tanto, presentan una frecuencia alélica baja (>5%).

## 8.5 Filtrado de variantes

Seleccionando el botón *Request: Filtering*, se accederá a una pantalla emergente con los distintos análisis de variantes generados hasta el momento.



The screenshot shows the 'Variants' interface with 19938 variants. The table displays columns: Chrom, Pos, Ref, Alt, Gene, Variant Type, Pos. Effect, Strand, Depth, Allele Depth, Allele Fraction, and Action. Several rows are highlighted in green and red, indicating different variant statuses or filters.

Figura 29. Filtrado de variantes con *Data Genomics*

Al acceder al análisis de variantes, aparecerán las variantes que hayan superado los criterios del filtro seleccionado. Para que el usuario valore si valida una variante como patogénica, aunque no cumpla alguno de los criterios del filtro, se recomienda limpiar el filtro anterior y aplicar un nuevo filtro para visualizar variantes patogénicas en la base de datos propia y/o Clinvar (*Clinical significance*).

La creación de nuevos filtros se lleva a cabo accionando el botón *Filters* desde la pantalla *Variants*. Aparece entonces, una ventana emergente desde la que se puede crear el filtro nuevo. Para ello habrá que ajustar las diferentes opciones a lo deseado por el usuario. Una vez se hallan elegido las características del filtro, se puede guardar (*Save*) y aplicar a la muestra actual seleccionando *Apply*.

Cada variante hallada llevará asociada una etiqueta de calidad en la columna *Fault summary*. Las posibles etiquetas, así como su descripción y toda la información aportada por el filtrado de variantes, se encuentra detallada en las instrucciones de uso de *Data*

*Genomics*, disponibles en: [www.datagenomics.com](http://www.datagenomics.com)

### 8.5.1 Categorización de variantes SNVs e INDELs y CNVs

Una vez se hayan llevado a cabo los filtros deseados por el usuario, cada variante hallada, ya sean variantes puntuales, pequeñas deleciones e inserciones o CNVs, puede ser categorizada.

Pinchando en la columna "Category", sobre cada variante, aparece un desplegable con las diferentes categorías a las que se puede asociar la variante, entre las que se encuentran: patogénica (P), probablemente patogénica (LP), variante de significado incierto (VUS), probablemente benigna (LB) o benigna (B).

En caso de no querer evaluar la variante o si se sospecha que se trata de un falso positivo, se recomienda categorizarla como "no evaluable/artefacto", que de ser seleccionada, impediría cualquier selección adicional.

Imegen aportará, en la columna *HIC Germinal Db*, la categorización de las variantes considerando el impacto funcional que causaría la variante a nivel biológico.

Tras el análisis de las muestras, es posible generar un archivo de las variantes seleccionadas, ya sea como csv o emitir un informe automático en pdf. Para ello, se accionará el botón "Report" y se finalizará el análisis tras una última revisión de las variantes seleccionadas para incluirlas en el informe.

Para cualquier duda sobre el análisis de resultados contacte con el soporte técnico de Imegen, y su incidencia quedará resuelta en un plazo de 24 horas.

## 9 Troubleshooting

A continuación, se enumeran los posibles resultados no esperados y las directrices para su solución para el protocolo de preparación de librerías y secuenciación utilizando **Hereditary Plus OncoKitDx**. Para la solución de otros problemas generales del equipo Magnis que no aparezcan en este apartado, consulte la guía del usuario del instrumento.

- **El uso de la pantalla táctil para la configuración del ensayo presenta problemas de funcionalidad:**

Como alternativa a los controles de la pantalla táctil, es posible el uso de un ratón conectado por USB a cualquiera de los dos puertos situados en la parte frontal del instrumento. Una vez conectado, se podrán realizar selecciones en la interfaz que se muestra en la pantalla táctil.

Para restablecer la funcionalidad de la pantalla táctil será necesario reiniciar el sistema.

- **Las luces del indicador LED del instrumento se iluminan en rojo y la pantalla táctil muestra el mensaje de error *"Teach points are shifted. Please perform auto teaching from the Settings screen"*:**

Este mensaje de error aparece cuando el *Instrument Health Check* (IHC) no ha superado alguno de sus puntos de control, lo que indica que dicho punto puede estar oculto, o que el instrumento necesita realizar una rutina de programación *Auto Teaching* antes de configurar un ensayo. Para preparar el equipo para el ensayo, realizar los siguientes pasos:

1. Verificar que todas las posiciones del equipo estén libres de material fungible del kit y otros residuos. La presencia de cualquier material en el equipo puede impedir la detección exitosa de todos los puntos de control verificados.
2. Limpiar la ventana del escáner de *barcode* según las instrucciones de limpieza de la Guía del usuario del equipo Magnis. Los residuos o huellas dactilares en el escáner pueden oscurecer los puntos de control verificados y, en consecuencia, provocar un fallo en la verificación.
3. Reiniciar el sistema. Después de iniciar sesión, el instrumento realizará otro IHC. Si

esta comprobación de estado se completa satisfactoriamente, puede reanudar el proceso de configuración sin realizar la rutina *Auto Teaching*.

Si el IHC no se completa satisfactoriamente, se deberá llevar a cabo la rutina de *Auto Teaching* siguiendo los siguientes pasos:

1. En la pantalla Home, abrir la pantalla *Settings* y presionar *Auto Teaching*. Seguir las instrucciones que aparecen en la pantalla táctil. El proceso de *Auto Teaching* tarda aproximadamente 30 minutos y requerirá la presencia del usuario para la colocación del material de laboratorio en el instrumento.
  2. Una vez finalizado el proceso de *Auto Teaching*, comenzar con la configuración del ensayo presionando "*Run Protocol*", en la pantalla "*Home*".
- **Las luces del indicador LED del instrumento se iluminan en rojo y la pantalla táctil muestra un mensaje de error de *Instrument Health Check* (IHC):**

Se recomienda reiniciar el instrumento después de un fallo del IHC, siguiendo los pasos que se indican a continuación:

1. En el cuadro de diálogo del error, presionar "*Cancel*" para rechazar el inicio de la prueba de diagnóstico.
2. Presionar el icono de error en la parte inferior de la pantalla y registrar el código de error para su posible uso en la solución de problemas con el soporte técnico de Agilent.
3. Apagar el instrumento presionando el botón de encendido en la parte frontal del instrumento.
4. Verificar que todas las posiciones del equipo estén libres de material fungible del kit y otros residuos. La presencia de cualquier material en la unidad del instrumento puede interferir con el IHC tras el reinicio.
5. Encender el instrumento presionando el botón de encendido.
6. Después de iniciar sesión, el equipo realizará otro IHC. Si esta comprobación de estado se completa satisfactoriamente, comenzar la configuración del ensayo. Si el IHC vuelve a fallar, póngase en contacto con el servicio de soporte técnico de Agilent para solicitar asistencia.



- **La pantalla *Verify Labware* informa de un problema con uno o más componentes del material de laboratorio después de hacer la verificación automatizada del material:**

Si todos o la mayoría de los materiales de laboratorio no superan la verificación, es posible que sea necesario limpiar la ventana del escáner. Consultar la Guía del usuario del instrumento para seguir las instrucciones de limpieza. Una vez finalizada la limpieza, repetir el paso *Verify Labware*.

Si sólo uno o unos pocos componentes del material de laboratorio no superan la verificación, presionar el icono de error en la parte inferior de la pantalla para expandir la información de la posición con error, y de esta forma consultar el motivo del fallo.

- Si el escáner de códigos de barras no puede escanear un componente concreto del material de laboratorio:

Comprobar que el material de laboratorio está presente en la posición requerida y orientado correctamente (revisar el apartado 7 de este documento para ver los pasos completos de carga del equipo). En caso de haberlos, corregir los errores y repetir el paso *Verify Labware*. Si todos los componentes están presentes y orientados correctamente, inspeccionar visualmente el código de barras para verificar su integridad. Para un escaneo exitoso, los *barcodes* no deben presentar arañazos, manchas, condensación, obstrucción por sellos de aluminio ni marcas de escritura o de otro tipo en el material plástico. En caso de que haya algún *barcode* dañado, será necesario sustituir el componente y repetir el paso *Verify Labware*.

- Si el material de laboratorio escaneado ha caducado:

Sustituir cualquier componente caducado con componentes no caducados y, a continuación, repetir el paso *Verify Labware*.

- Si el material de laboratorio escaneado está en una posición incorrecta:

Sustituir el material de laboratorio inadecuado por el componente correcto y repetir el paso *Verify Labware*.

- **La pantalla táctil muestra un valor de *Time Remaining* de 0:00 al final del ensayo durante cierto tiempo sin pasar a las pantallas de ensayo/recolección de muestras:**

El valor *Time Remaining* mostrado en la pantalla táctil es sólo una estimación del tiempo restante del ensayo, y puede permanecer en 0:00 durante varios minutos antes de que

el sistema esté listo para comenzar la recolección de muestras. Esto no indica que haya problemas ni en el ensayo ni en el instrumento.

- **El tamaño de las librerías es mayor de lo esperado en los electroferogramas:**

Verificar el correcto desarrollo del protocolo de fragmentación enzimática (apartado 7 de este documento).

Considerar la repetición del experimento con un ADN de control para verificar que las muestras experimentales no contienen inhibidores de la reacción de fragmentación.

- **Bajo rendimiento de las librerías de post-captura:**

Comprobar que la muestra de ADN de entrada cumple con las directrices de calidad y concentración especificadas.

Comprobar que el ensayo se haya configurado para la concentración y calidad de ADN adecuadas. En la pestaña *Run Setup* de la pantalla Post Run Data se puede revisar la configuración de los ensayos llevados a cabo.

Comprobar que los ensayos se realicen en condiciones de humedad del 30% al 70% (sin condensación). Fuera de este rango de humedad el rendimiento puede verse afectado.

Un rendimiento muy bajo o nulo en una o más muestras del ensayo puede ser indicativo de un problema con las puntas empleadas en el ensayo. Para llevar a cabo el protocolo correctamente, las cajas de puntas deben estar completamente llenas, bien fijadas y dentro de los marcos de sus plataformas.

- **Densidad del *cluster* diferente de lo esperado:**

En este caso es recomendable revisar la cuantificación de librerías y el protocolo de generación del *pool* de librerías antes de secuenciar.

- **Errores en el STID:**

En caso de utilizar los reactivos de trazabilidad de muestras proporcionados por *Imegen*, es posible que ocurra que el STID no coincida con el esperado. En este caso, se recomienda comprobar los STID especificados en la Hoja de muestras.

- **Problemas de cobertura:**

Los problemas de cobertura que afectan a otras regiones además de las incluidas en la sección de limitaciones del kit, pueden deberse a una mala calidad del ADN o problemas

en el protocolo de preparación y / o captura de las librerías. Se recomienda verificar la calidad del ADN inicial y si el problema de calidad afecta a todas las muestras, se recomienda revisar todos los pasos del protocolo.

## 10 Limitaciones

### 10.1 Analíticas

- La tecnología empleada no permite distinguir entre regiones que presenten una alta homología en su secuencia, como pueden ser genes homólogos, pseudogenes, etc., pudiendo dar lugar a falsos positivos o negativos. Las regiones pseudogénicas concretas aparecen listadas en la Tabla 14. En el análisis de resultados, en la columna “*Fault summary*” aparecerá la etiqueta “*Pseudogenic\_homology*”, cuando se detecte una variante en una región de homología con pseudogenes.

| Cromosoma | Posición de inicio | Posición final | Gen    | Exón | Secuencia de referencia |
|-----------|--------------------|----------------|--------|------|-------------------------|
| 1         | 161332141          | 161332340      | SDHC   | EX5  | NM_001035511.2          |
| 3         | 178937348          | 178937413      | PIK3CA | EX12 | NM_006218.4             |
| 3         | 178937747          | 178937850      | PIK3CA | EX13 | NM_006218.4             |
| 5         | 251442             | 251527         | SDHA   | EX13 | NM_004168.4             |
| 7         | 6013019            | 6013183        | PMS2   | EX15 | NM_000535.7             |
| 7         | 6017208            | 6017322        | PMS2   | EX14 | NM_000535.7             |
| 7         | 6022444            | 6022632        | PMS2   | EX12 | NM_000535.7             |
| 7         | 6027210            | 6027261        | PMS2   | EX11 | NM_000535.7             |
| 10        | 89725087           | 89725232       | PTEN   | EX9  | NM_000314.8             |

Tabla 14. Listado de regiones pseudogénicas

- Además, debido a la gran homología entre el gen PMS2 y sus pseudogenes en los exones 11–15, el análisis de CNVs llevado a cabo no permitirá diferencias el número de copias que provienen del gen y las que provienen del pseudogen.
- Por debajo de los parámetros de calidad establecidos no podemos dar garantías de los resultados obtenidos.
- La tecnología NGS todavía no se considera la técnica *Gold Standard* para algunos tipos de mutación, por lo que se recomienda, siempre que sea posible, confirmar los resultados positivos mediante una tecnología complementaria y estandarizada.
- Todos los datos e información obtenida deben ser evaluados e interpretados por el clínico, de manera integrada, junto con el resto de información clínica del paciente.

## 10.2 Equipos

**Hereditary Plus OncoKitDx** ha sido validado usando el siguiente termociclador para la fragmentación del ADN:

- GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)

Si va a usar otra marca o modelo de termocicladores, podría necesitar ajustar el programa de amplificación. Por favor, contacte con nuestro soporte técnico para cualquier consulta o aclaración.

**Hereditary Plus OncoKitDx** ha sido validado usando el siguiente equipo automatizado de preparación de librerías:

- Magnis NGS Prep System, de Agilent Technologiesn (cat. no. G9710AA)

**Hereditary Plus OncoKitDx** ha sido validado usando las siguientes plataformas de secuenciación masiva:

- MiSeq System (Illumina)
- NextSeq System (Illumina)

Este kit únicamente es compatible con plataformas de secuenciación masiva de Illumina. En caso de utilizar otros equipos de secuenciación masiva distintos al NextSeq System, la concentración final de las librerías tendrá que ajustarse a las especificaciones de los protocolos específicos de dichas plataformas.

## 10.3 Reactivos

**Hereditary Plus OncoKitDx** se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y los recomendados en el apartado 6 de este manual (Equipos y materiales necesarios que no se suministran).

Para la secuenciación por NGS se recomienda emplear los reactivos recomendados por el proveedor del secuenciador: Illumina.

En caso de duda, por favor contacte con el soporte técnico de Imegen.

#### 10.4 Plataforma de análisis bioinformático

**Hereditary Plus OncoKitDx** ha sido validado empleando Data Genomics, plataforma de análisis bioinformático para diagnóstico *in vitro*. Dicha plataforma incluye una *pipeline* de análisis diseñada especialmente para **Hereditary Plus OncoKitDx**, la cual permite la detección de todas las dianas especificadas en el apartado 2 de este documento.

En caso de usar otra plataforma de análisis, Imegen no se hace responsable de los resultados obtenidos.

#### 10.5 Estabilidad del producto

El funcionamiento óptimo de este producto está confirmado siempre que se apliquen las condiciones recomendadas de almacenamiento especificadas dentro de la fecha óptima del producto asociada a cada lote de producción.