imegen

Bringing genomics to health

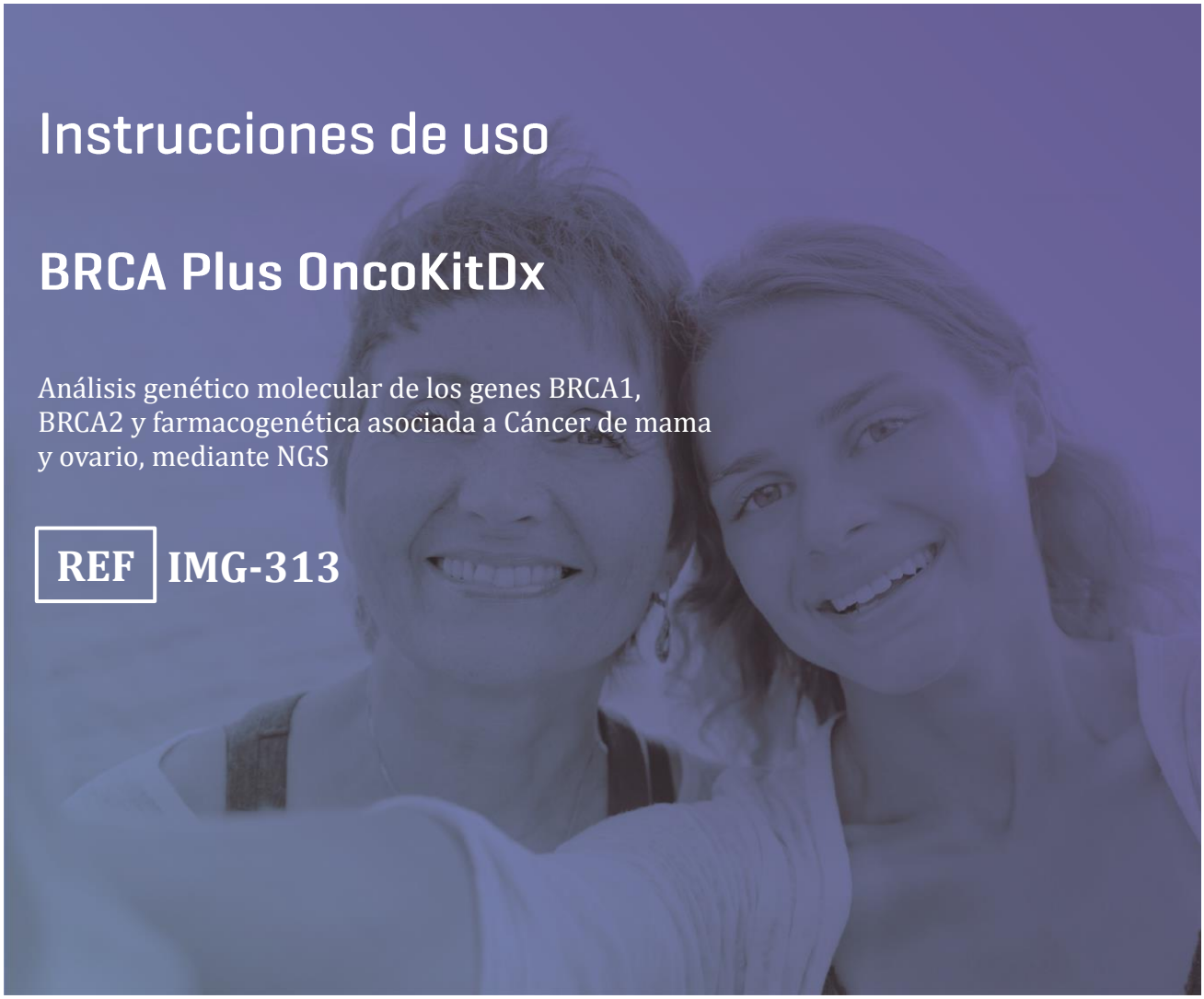
CE IVD

Instrucciones de uso

BRCA Plus OncoKitDx

Análisis genético molecular de los genes BRCA1, BRCA2 y farmacogenética asociada a Cáncer de mama y ovario, mediante NGS

REF IMG-313



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

imegen.es

ISO 13485
BUREAU VERITAS Certification
Nº ES069949-1

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. **BRCA 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

*imegen® es una marca registrada del Instituto de Medicina Genómica en España

Modificaciones de las Instrucciones de Uso (IFU)	
Versión 02	Cambio introducido: Adaptación a los requisitos del Reglamento (UE) 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2017, sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro.

imegen

Índice

1. **Información general** 4
2. **Uso previsto** 5
3. **Características técnicas** 6
4. **Advertencias y precauciones de seguridad** 7
5. **Contenido y condiciones de almacenamiento del kit** 8
6. **Equipos y materiales necesarios que no se suministran** 10
7. **Protocolo de ensayo** 12
   - 7.1 Primera reacción de amplificación 12
   - 7.2 Purificación de los productos de la primera PCR 13
   - 7.3 Segunda reacción de amplificación 14
   - 7.4 Purificación de las librerías 15
   - 7.5 Preparación de las librerías para la secuenciación 15
8. **Análisis de los resultados** 17
   - 8.1 Solicitud de análisis 20
   - 8.2 Gestión de solicitudes 20
   - 8.3 Filtrado de variantes 22
   - 8.4 Análisis de grandes reordenamientos CNVs 23
   - 8.5 Análisis de farmacogenética 27
9. **Troubleshooting** 28
10. **Limitaciones** 31
    - 10.1 Equipos 31
    - 10.2 Reactivos 31
    - 10.3 Estabilidad del producto 31

1. Información general

El término cáncer hace referencia a un grupo muy amplio y variado de enfermedades que se caracterizan por un crecimiento descontrolado de células que pueden diseminarse 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 el genoma, que dan lugar a una pérdida del control de determinados procesos biológicos, ocasionando un crecimiento celular descontrolado.

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común en mujeres, con un riesgo en la población general superior al 10%. Entre el 5 y el 10% de los cánceres de mama/ovario son familiares (MIM #604370) y siguen un patrón de herencia autosómico dominante.

El cáncer de mama/ovario familiar está asociado a mutaciones germinales, en el gen *BRCA1* (MIM *113705; NG_005905.2) o *BRCA2* (MIM*600185; NG_012772.1) que confieren una elevada susceptibilidad a padecer esta enfermedad. Se han descrito cientos de variaciones, tanto en *BRCA1* como *BRCA2*.

En la actualidad numerosos ensayos clínicos han incorporado pruebas farmacogenéticas con el fin de seleccionar a los pacientes que mejor pueden beneficiarse de los tratamientos farmacológicos. La farmacogenética trata de estudiar las causas genéticas subyacentes a la diversidad de respuestas que se observan para una misma dosis de un determinado medicamento. Por ello puede entenderse como el análisis y uso de la información genética, individual o poblacional, para predecir la seguridad, toxicidad o eficacia de los medicamentos. Los agentes quimioterápicos en general, presentan un estrecho margen terapéutico, por lo que la variabilidad interindividual en su metabolismo determina tanto su eficacia como su seguridad.

Referencias

- Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (review). Kobayashi H1, Ohno S, Sasaki Y, Matsuura M. Oncol Rep. 2013 Sep;30(3):1019-29. doi: 10.3892/or.2013.2541.
- Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. Nancie Petrucelli, Mary B Daly & Gerald L Feldman. Genetics in Medicine volume 12, pages 245–259 (2010)
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Breast Cancer. Version 2.2017
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian. Version 2.2017

2. Uso previsto

BRCA Plus OncoKitDx ha sido diseñado para identificar las mutaciones puntuales y pequeñas inserciones y deleciones en las regiones codificantes, así como los sitios de *splicing* de los genes *BRCA1* y *BRCA2*.

Además, este kit permite detectar grandes deleciones y duplicaciones (CNVs).

En relación con la farmacogenética germinal, **BRCA Plus OncoKitDx** permite el análisis de las regiones del genoma implicadas en el metabolismo de los quimioterapéuticos usualmente indicados para el tratamiento del cáncer de mama y ovario (5-Fluoracilo, Capecitabina, Cisplatino y Tamoxifeno). Se trata de un análisis de las variantes poblacionales (polimorfismos) en la secuencia de los genes codificantes de las enzimas metabolizadoras de estos agentes quimioterapéuticos.

Los polimorfismos analizados son los que mayor evidencia científica presentan de acuerdo con PharmaGKB, que engloba y evalúa la información procedente de la FDA (Food & Drug Administration), la EMA (European Medicines Agency), PMDA (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency of Japan) y HCSC (Health Canada Santé Canada).

Los polimorfismos analizados se detallan a continuación:

- *TYMS*: Polimorfismo (rs151264360) relacionado con la disminución de la capacidad metabolizadora de los quimioterapéuticos 5-Fluoracilo y Capecitabina.
- *DPYD*: Incluye el análisis de tres polimorfismos (rs3918290, rs55886062 y rs67376798) relacionados con la capacidad de metabolización de los quimioterapéuticos 5-Fluoracilo y Capecitabina.
- *XPC*: Polimorfismo (rs2228001) relacionado con la capacidad de metabolización, y consiguiente aumento de toxicidad del quimioterapéutico Cisplatino.
- *CYP2D6*: Polimorfismo (rs3892097) relacionado con el metabolismo del fármaco Tamoxifeno.

BRCA Plus OncoKitDx analiza ADN germinal de pacientes con predisposición a padecer cáncer de mama y ovario, mediante PCRs multiplexadas y posterior secuenciación con plataformas NGS, tecnología de secuenciación masiva de alto rendimiento.

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

3. Características técnicas

Este kit ha sido validado utilizando muestras de ADN de referencia y muestras previamente genotipadas con otras tecnologías. En dicha validación se ha comprobado que se detectan de manera específica las variantes presentes en las regiones diana del producto, especificadas en el apartado 2 de este manual (Finalidad del producto), y que dicho análisis fuera reproducible.

Especificidades técnicas:

- Tipo de muestra: ADN procedente de sangre periférica.
- Cantidad de ADN requerida: 40 ng.
- Cobertura: 100 % de las bases cubiertas a una profundidad de 100X.
- Uniformidad: 100 % de las bases cubiertas a >20 % de la media de cobertura.
- Sensibilidad y especificidad: >99 %.

BRCA Plus OncoKitDx es compatible con plataformas de secuenciación masiva de Illumina.

Este producto cumple con los requisitos de calidad especificados por la ISO 13845 en lo referente a los materiales empleados en su proceso de fabricación.

4. Advertencias y precauciones

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.

5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

Este kit contiene reactivos suficientes para la realización de 20 determinaciones. La relación de reactivos incluidos en el kit es la siguiente:

- General Master Mix III: Master mix general de PCR con las cantidades de enzima, nucleótidos y tampón necesarios para llevar a cabo las reacciones de amplificación.
- BRCA Plus Buffer: Contiene $MgCl_2$ a la concentración necesaria para llevar a cabo las reacciones de amplificación.
- Water: Agua libre de nucleasas necesaria en las reacciones de PCR.
- Pool A y Pool B PCR: Contienen los oligonucleótidos necesarios para llevar a cabo la amplificación las regiones diana del kit.
- Index: Oligonucleótidos, usados en la segunda reacción de PCR, con una secuencia única de 8 nucleótidos, compatible con los adaptadores de Illumina. Los Index son necesarios para marcar las librerías de cada muestra con una combinación única que permitirá su análisis y discriminación tras la secuenciación. El kit incluye los index necesarios para la secuenciación simultánea de 20 muestras.

Los reactivos se encuentran repartidos en dos cajas, Box 1 y Box 2, con los reactivos necesarios para la preparación de la 1ª y la 2ª PCR, respectivamente.

BOX 1			
Reactivos	**Color**	**Cantidad**	**Conservación**
General Master Mix III	Disco Blanco	160 µL	-20ºC
BRCA Plus Buffer	Disco Negro	145 µL	-20ºC
Water	Disco Verde	296 µL	-20ºC
Pool A PCR	Disco Morado	60 µL	-20ºC
Pool B PCR	Disco Amarillo	60 µL	-20ºC

Tabla 1. Componentes de la caja 1 de BRCA Plus OncoKitDx

BOX 2			
Reactivos	**Color**	**Cantidad**	**Conservación**
General Master Mix III	Disco Blanco	240 µL	-20ºC
BRCA Plus Buffer	Disco Negro	216 µL	-20ºC
Water	Disco Verde	384 µL	-20ºC
Index S513	Disco Rojo	20 µl	-20ºC
Index S517	Disco Rojo	20 µl	-20ºC
Index S518	Disco Rojo	20 µl	-20ºC
Index S520	Disco Rojo	20 µl	-20ºC
Index N718	Disco Azul	20 µl	-20ºC
Index N719	Disco Azul	20 µl	-20ºC
Index N720	Disco Azul	20 µl	-20ºC
Index N721	Disco Azul	20 µl	-20ºC
Index N722	Disco Azul	20 µl	-20ºC

Tabla 2. Componentes de la caja 2 de BRCA Plus OncoKitDx

6. Equipos, reactivos y materiales necesarios no suministrados

Equipos:

- Termociclador
- Micropipetas de 10 µL, 20 µL, 200 µL y 1000 µL
- Vortex
- Centrífuga
- Soporte imantado para tubos de 1.5 mL
- Bloque agitador para tubos de 1.5 mL
- Fluorímetro (Recomendado: Qubit; ThermoFisher)
- Secuenciador NGS (Illumina)
- TapeStation System de Agilent Technologies (opcional)

Reactivos:

- Agentcourt® AMPure® XP beads (cat. no. A63880, A63881 o A63882; Beckman Coulter Genomics)
- Etanol absoluto
- Elution Buffer (cat.no.19086; Qiagen)
- Agua libre de nucleasas
- Recomendado: Qubit dsDNA HS Assay kit (cat. no. Q32854; Invitrogen)
- NaOH 0.2N (cat.no. 1091401000; Fluka)
- PhiX Control v3 (cat. no. FC-110-3001; Illumina)
- TapeStation (Opcional): High Sensitivity D1000 Reagments (cat. no. 5067-5585; Agilent)

Materiales:

- Puntas de pipetas con filtro (10 µL, 20 µL, 200 µL y 1000 µL)
- Tubos estériles de 0.2 mL y 1.5 mL
- Guantes de látex
- Qubit (recomendado): Qubit™ assay tubes (Ref: Q32856; Invitrogen)
- TapeStation (Opcional): High Sensitivity D1000 ScreenTape (cat. no. 5067-5584; Agilent)

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

NOTA **BRCA Plus OncoKitDx** está preparado para usarse en combinación con los kits **imegen-Sample tracking A y B (REF: IMG-234 y IMG-311)**, 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 disponibles bajo petición.

7. Protocolo de ensayo

BRCA Plus OncoKitDx incluye dos pools de cebadores (PCR-Pool A y PCR-Pool B), necesarios para amplificar las regiones genómicas de interés mediante PCR multiplex. Por tanto, para cada muestra se llevarán a cabo dos reacciones de PCR, una para el Pool A, y otra para el Pool B.

Nota: Para el cálculo de CNVs se requiere un mínimo de 10 muestras en un mismo experimento. (Para obtener más información, ver el apartado dedicado al análisis de CNVs de la sección 8 de estas instrucciones de uso).

7.1 Preparación de la primera reacción de amplificación

1. Descongelar el General Master Mix III, BRCA Plus Buffer, Pool A PCR, Pool B PCR y el ADN de las muestras. Agitar en vortex cada uno de los reactivos y mantener en frío.
2. Añadir las cantidades necesarias de los reactivos indicados a continuación, a tubos de 1,5mL, en función del número de reacciones totales. Se recomienda realizar los cálculos añadiendo reactivos suficientes para analizar una reacción más, o bien añadir un 10% más de cada uno de los reactivos.

Reactivos	Volumen Pool A	Volumen Pool B
General Master Mix III	4 µL	4 µL
BRCA Plus Buffer	3,6 µL	3,6 µL
Agua	7,4 µL	7,4 µL
Pool A PCR	3 µL	-
Pool B PCR	-	3 µL

3. Agitar en vortex a los mix de PCR y distribuir 18 µl en los pocillos de PCR correspondientes. **Opcional:** Seleccionar uno de los doce reactivos de seguimiento de la muestra (Sample tracking A Kit, REF. IMG-234) y añadirlo a la muestra aplicándole una dilución 1/5. Ejemplo: 1µl de plásmido + 4 µl de la muestra a la concentración indicada en el paso siguiente. Para casos en los que se analizan más de doce muestras por tanda se ha desarrollado la referencia Sample tracking B Kit, REF. IMG-311.
4. Cuantificar las muestras de ADN con el fluorímetro Qubit (ThermoFisher).
5. Añadir 2 µl de ADN de la muestra a 10 ng/µL o de agua libre de nucleasas (control negativo) a los pocillos correspondientes. En caso de que la muestra extraída tenga una concentración menor, se puede ajustar el volumen de muestra con el volumen de agua correspondiente para que en la reacción haya 20 ng totales de ADN.

6. Colocar los tubos en el termociclador y ejecutar el siguiente programa de amplificación con el ratio de rampas apropiado (4°C/s):

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	15 minutos	1
95°C	30 segundos	22
60°C	3 minutos	
72°C	30 segundos	
72°C	5 minutos	1
10°C	∞	1

Tabla 3. Programa de PCR óptimo para SimpliAmp Thermal Cycler y GeneAmp PCR System 9700

7.2 Purificación de los productos de la primera PCR

Para este proceso es necesario atemperar los reactivos AMPure XP Beads (REF: A63881; Beckman Coulter Inc) y Elution Buffer (REF: 19086; Qiagen) 30 minutos antes de utilizarlos y preparar 400 µL de etanol al 80% por reacción.

1. Agitar vigorosamente el tubo que contiene las partículas magnéticas.
2. Atemperar durante 30 minutos el volumen de partículas magnéticas que se vaya a utilizar según el número de muestras (23,8 µl por cada reacción).
3. Preparar un tubo eppendorf de 1,5 mL por reacción.
4. Dispensar 23,8 µL de partículass magnéticas en cada tubo eppendorf de 1,5 mL.
5. Transferir 17 µL de cada producto de PCR al tubo de 1,5 mL correspondiente.
6. Agitar los tubos en un bloque agitador, durante 2 minutos, a 1800 rpms y a temperatura ambiente.
7. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Colocar los tubos en un soporte imantado durante 2 minutos para que las partículas magnéticas se adhieran al imán.
9. Retirar el sobrenadante pipeteando con cuidado.
10. Añadir 200 µL de EtOH al 80%, preparado en el momento.
11. Repetir los pasos 9 y 10 del protocolo.
12. Retirar el sobrenadante. Evitar que queden restos de etanol en el tubo.
13. Dejar secar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Eliminar cualquier resto de etanol que haya podido quedar adherido a las paredes del tubo.
14. Añadir 17 µL del reactivo *Elution Buffer* (Ref: 19086; Qiagen).

15. Retirar los tubos del soporte imantado y resuspender vigorosamente con vortex hasta que la solución partículas magnéticas-*elution buffer* quede homogénea.
16. Incubar 2-10 minutos a temperatura ambiente.
17. Colocar de nuevo los tubos en el soporte imantado durante 2 minutos para que las partículas magnéticas se adhieran al imán.
18. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y descartar el tubo con las partículas magnéticas.

Si se va a llevar a cabo la segunda PCR en las próximas 24 horas, conservar el producto de PCR a 4 ºC. De lo contrario, conservar a -20 ºC hasta el momento de su uso.

7.3 Preparación de la segunda reacción de amplificación

En la segunda reacción de amplificación tiene lugar la adición de los index y adaptadores necesarios para la posterior secuenciación masiva con plataformas de Illumina.

Para cada muestra preparar dos reacciones, una para el Pool A y otra para el Pool B, siguiendo el siguiente protocolo:

1. Descongelar el General Master Mix III, BRCA Plus Buffer, los index necesarios y los productos de la primera PCR en caso de haber sido congelados. Agitar en vortex a cada uno de los reactivos y mantener en frío. Para cada muestra serán necesarios un Index S y un Index N. En caso de analizar varias muestras en un mismo run, cada muestra debe tener una combinación de Index S y N única.
   Estas secuencias se indican en la tabla siguiente:

Nombre	Secuencia
Index S513	TCGACTAG
Index S517	GCGTAAGA
Index S518	CTATTAAG
Index S520	AAGGCTAT
Index N718	GGAGCTAC
Index N719	GCGTAGTA
Index N720	CGGAGCCT
Index N721	TACGCTGC
Index N722	ATGCGCAG

Tabla 4. Secuencias de cada index

2. Descongelar el producto de la primera PCR en caso de haberlo congelado. Agitar en vortex y dar spin a los tubos.

3. Añadir 1 µL del producto de PCR y 499 µL de agua libre de nucleasas a un tubo nuevo de 1.5mL.
4. Agitar en vortex y dar spin a los tubos de los productos de PCR diluidos.
5. Añadir las cantidades de reactivo especificadas a continuación a tubos de 1.5 mL. Se recomienda realizar los cálculos añadiendo reactivos suficientes para analizar una muestra más, o bien añadir un 10% más de cada uno de los reactivos.

Reactivos	Volumen por muestra
General Master Mix III	12 µL
BRCA Plus Buffer	10.8 µL
Agua	19.2 µL
Index S	3 µL
Index N	3 µL

6. Agitar en vortex los mix de PCR y distribuir 24 µL en cada pocillo de PCR, uno para el Pool A y otro para el Pool B.
7. Añadir 6 µL del producto de PCR diluido a los pocillos correspondientes.
   Nota: Al tratarse de una PCR en la que como ADN molde se utilizan productos ya amplificados, para evitar posibles contaminaciones, recomendamos preparar el mix de PCR en un laboratorio pre-PCR y realizar el paso 7 del protocolo en una zona post-PCR. Además, se recomienda limpiar las superficies de laboratorio con productos de descontaminación de ADN.
8. Colocar los tubos en el termociclador y ejecutar el siguiente programa de amplificación con el ratio de rampas adecuado (4°C/s):

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	15 minutos	1
95°C	30 segundos	25
60°C	90 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	5 minutos	1
10°C	∞	1

Tabla 5. Programa de PCR óptimo para SimpliAmp Thermal Cycler y GeneAmp PCR System 9700

7.4 Purificación de las librerías

Para este proceso es necesario atemperar los reactivos AMPure XP Beads (REF: A63881; Beckman Coulter Inc) y Elution Buffer (Ref: 19086; Qiagen) 30 minutos antes de utilizarlos y preparar 400 µL de etanol al 80% por reacción.

1. Agitar vigorosamente el tubo que contiene las partículas magnéticas.
2. Atemperar durante 30 minutos el volumen de partículas magnéticas que se vaya a utilizar según el número de muestras (50 µL por cada muestra).
3. Preparar un tubo eppendorf de 1.5 mL por muestra.
4. Dispensar 40 µL de partículas magnéticas en cada tubo eppendorf de 1.5 mL.
5. Transferir 25 µL del Pool A y 25 µL del Pool B por muestra a un único tubo eppendorf de 1.5mL.
6. Agitar los tubos en el bloque agitador, durante 2 minutos, a 1800 rpms y a temperatura ambiente.
7. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Colocar los tubos en un soporte imantado durante 2 minutos para que las partículas magnéticas se adhieran al imán.
9. Retirar el sobrenadante pipeteando con cuidado.
10. Añadir 200 µL de EtOH al 80%, preparado en el momento.
11. Repetir los pasos 8 y 9 del protocolo.
12. Retirar el sobrenadante. Es muy importante que no queden restos de etanol.
13. Dejar secar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Eliminar cualquier resto de etanol que haya podido quedar adherido a las paredes del tubo.
14. Añadir 52 µL del reactivo *Elution Buffer* (Ref: 19086; Qiagen).
15. Retirar los tubos del soporte imantado y resuspender vigorosamente con vortex hasta que la solución partículas magnéticas-*elution buffer* quede homogénea.
16. Incubar 2-10 minutos a temperatura ambiente.
17. Colocar de nuevo los tubos en el soporte imantado durante 2 minutos para que las partículas magnéticas se adhieran al imán.
18. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y descartar el tubo con las partículas magnéticas.

Si se va a continuar con el protocolo en las próximas 24 horas, conservar las librerías a 4 °C. De lo contrario, conservar a -20 °C hasta el momento de su uso.

7.5 Preparación de las librerías para la secuenciación

Cálculo de la concentración de las librerías

Imegen recomienda comprobar el tamaño de las librerías obtenidas empleando la Tape Station 2200 y los kits comerciales High Sensitivity D1000 reagments (Ref:5067-5585) y High Sensitivity D1000 ScreenTape (Ref:5067-5584) de Agilent Technologies, o analizándolas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3% con un voltaje de 120 durante 30 minutos. El tamaño medio obtenido debe ser próximo a 300 pb como se muestra en la siguiente imagen.

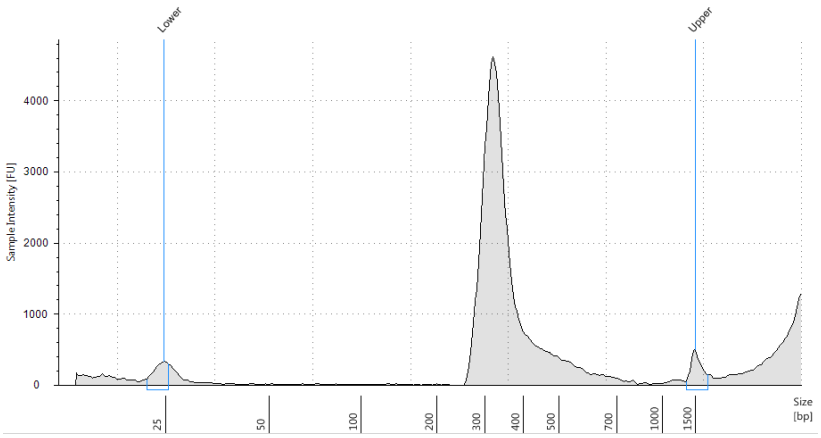


Figura 1. Resultado del tamaño esperado del análisis de las librerías por TapeStation 2200

A continuación, para medir la concentración del ADN, se recomienda el uso del fluorímetro Qubit® 2.0, el kit comercial Qubit ds DNA HS Assay kit (Ref: Q32854) y los tubos Qubit™ assay tubes (Ref: Q32856) de Invitrogen.

Para calcular la concentración de las librerías, con los datos de concentración del ADN y del tamaño medio de las librerías aplicar la siguiente fórmula:

$$Concentración\ librerías\ (nM) = \left(Concentración\ \left({}^{ng}/_{\mu l}\right) x\ 5.11\right)$$

Nota: El valor 5.11 resulta del tamaño medio del amplicón y la conversión de unidades.

Generación de la Sample Sheet

La *Sample Sheet* se puede generar empleando el programa Illumina Experiment Manager, siguiendo los siguientes pasos:

1. Abrir el programa y seleccionar la opción: Create Sample Sheet.

2. Seleccionar la opción Miseq>Next.
3. Seleccionar Other>FASTQ Only>Next.
4. Rellenar para cada ensayo los campos: Reagent Cartridge Barcode, Library Prepr Workflow *(Nextera XT), Index Adapters (Kit D), Index Reads (2, dual), Experiment Name, Investigator Name y Description*. El resto de campos quedarán como en la imagen que se muestra a continuación:

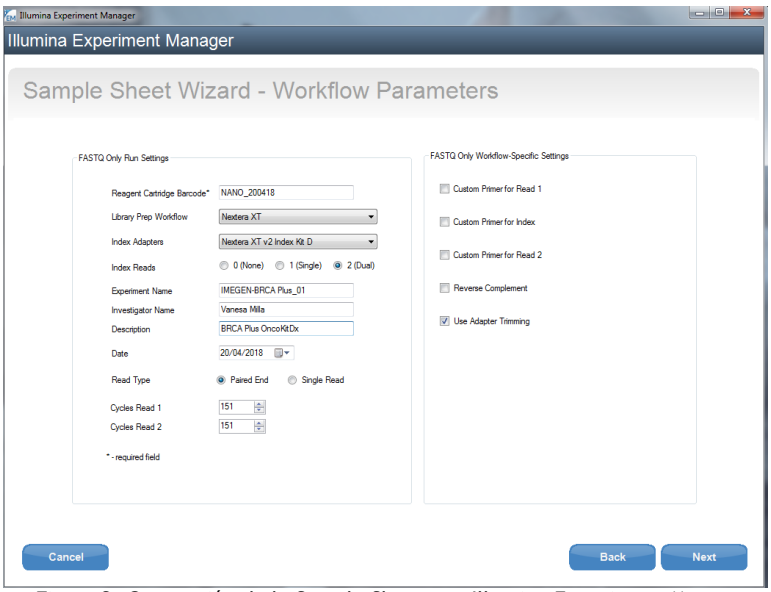


Figura 2: Generación de la Sample Sheet con Illumina Experiment Manager

5. Seleccionar *Next.*
6. En la siguiente pantalla, se debe añadir una fila por cada muestra incluida en el ensayo (seleccionando *Add Blank Row*).
7. Rellenar los campos de cada muestra.
8. Por último seleccionar *Finish*.
9. Aparecerá la opción de guardar la *Sample Sheet* creada. Guardar como .csv.

Desnaturalización y carga de las librerías

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 nano 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 diluído a 12.5 pM (seguir el protocolo de desnaturalización de PhiX Control v3, proporcionado junto con el reactivo por Illumina).

3. Diluir cada librería a una concentración de 2 nM con el reactivo *Elution Buffer.*
4. Unir todas las librerías que se vayan a cargar en un mismo run en un único pool. Para ello, se añaden 10 µL de cada una de ellas a un tubo nuevo de 1.5 mL. Agitar en vortex y dar spin al tubo.
5. Añadir 5 µL del pool de librerías a un tubo de 1.5 mL y 5 µL de NaOH 0.2N (No suministrado con el kit). Agitar en vortex y dar spin al tubo.
6. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Añadir 990 µL de HT1 y agitar en Vortex.
8. A este mix, añadir 10 µL de PhiX control desnaturalizado y diluído a 12.5 pM. En este momento las librerías estarán a 9 pM.
9. 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 dependiendo del kit de secuenciación usado, para garantizar un número mínimo de clusters de, aproximadamente 100.000 por muestra, y una profundidad mínima de 100x.

MiSeq Reagents Kit	Nº máximo de muestras
MiSeq Reagents nano Kit v2 (300 ciclos). Ref: MS-103-1001	10
MiSeq Reagents micro Kit v2 (300 ciclos). Ref: MS-103-1002	40

Tabla 6. Muestras recomendadas a analizar con BRCA Plus OncoKitDx

En caso de utilizar otros kits de secuenciación de mayor capacidad se pueden cargar las librerías de **BRCA Plus OncoKitDx** junto con otras, siempre y cuando estén marcadas con index de 8 nucleótidos.

Una vez creada la *Sample Sheet* y desnaturalizadas las librerías, se seguirán los pasos indicados por el secuenciador para iniciar el proceso de secuenciación (Miseq Control Software).

8. Análisis de los resultados

El análisis bioinformático de los resultados se realiza mediante una pipeline de análisis diseñada especialmente para **BRCA Plus OncoKitDx**, con la plataforma DataGenomics. El acceso a esta herramienta se podrá realizar vía www.imegen.es/datagenomics.

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

8.1 Solicitud de análisis

1. Seleccionar "Import Sample" en la pantalla principal (pantalla Orders) para poder llevar a cabo la solicitud de análisis de cada muestra. De esta forma se accede a la pantalla de importación de ficheros. En dicha pantalla se deben importar los ficheros fastq asociados a las muestras y, opcionalmente, el fichero de la *SampleSheet*, que permitiría importar todos los ficheros del mismo run de secuenciación simultáneamente.
2. Una vez cargados los ficheros, se deberá indicar el nombre del run de secuenciación y seleccionar la modalidad de estudio **BRCA Plus OncoKitDx** y el STID (Sample Tracking ID) usado en cada muestra (o "no contiene" en caso de no haber utilizado ninguno).
3. Para llevar a cabo la solicitud, seleccionar "Process". Cuando haya finalizado el proceso con éxito aparecerá un mensaje: " ✓ La importación se ha realizado correctamente".

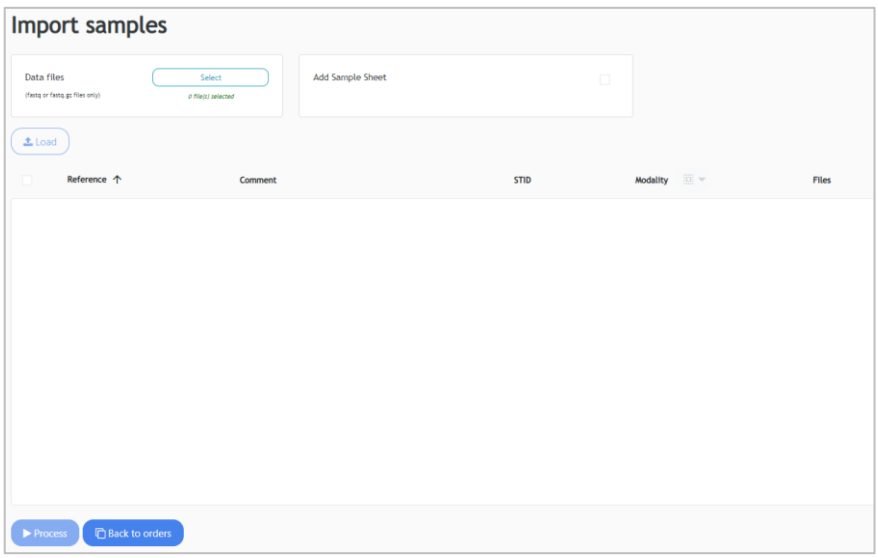


Figura 3. Pantalla para importar los ficheros fastq, la sample sheet e iniciar la solicitud de análisis.

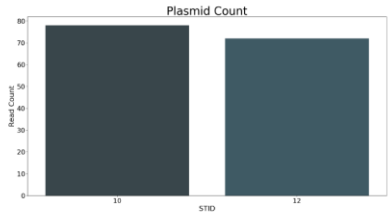
8.2 Gestión de solicitudes

Todas las solicitudes creadas aparecerán en la pantalla "Orders" dentro del correspondiente apartado según el estado en el que se encuentran (en espera, pendiente, en proceso, finalizado, cancelado o en revisión). 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.

En caso de que la secuenciación no haya pasado los controles de calidad establecidos o de que el reactivo de trazabilidad no coincida con el esperado, aparecerá una alerta sobre el botón correspondiente al control de calidad ("Request: Bioinformatics"), una vez haya finalizado el análisis bioinformático. seleccionando este icono se accederá directamente al informe del control de calidad.

El acceso a todos los ficheros descargables producto del análisis bioinformático puede llevarse a cabo seleccionando el botón "*Show results*". En esta pantalla aparecen a disposición del usuario los ficheros resultantes del análisis bioinformático: los ficheros de alineamiento (bam y bai), el listado de variantes (vcf), además de otros ficheros con información sobre coberturas, polimorfismos asociados con farmacogenética, cálculo de CNVs y el informe de calidad de la secuenciación, donde se incluye la comprobación de que el reactivo de trazabilidad obtenido coincide con el esperado, como se muestra en la figura siguiente:



Counts of each plasmid detected.

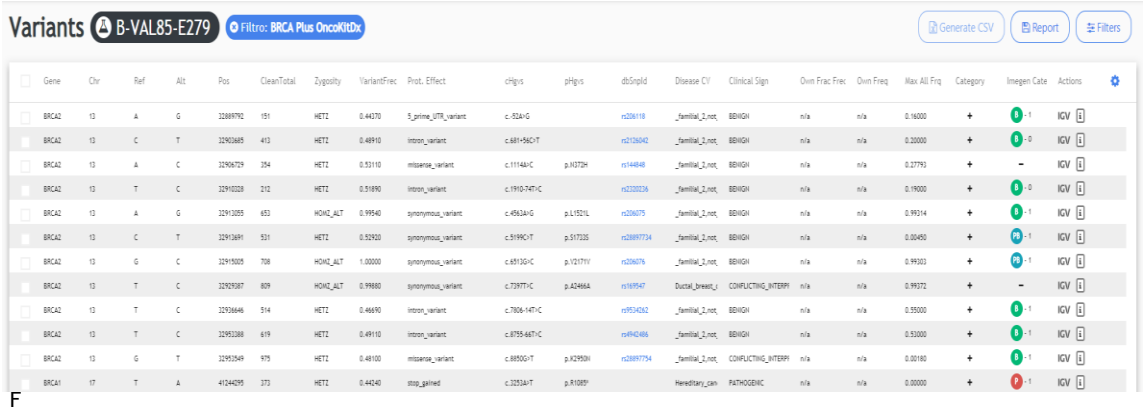
QC of the tracking sample

Feature	Obtained	Expected	Status
STID	1012	1210	MATCH

Figura 4. Control de calidad del sistema integrado de trazabilidad (opcional)

8.3 Filtrado de variantes

Seleccionando el botón de "*Filtering*", se accederá a una pantalla emergente con **todas las** variantes encontradas en *BRCA1* y *BRCA2*, y los datos relacionados a dichas variantes.



F

Figura 5. Filtrado de variantes con DataGenomics

- En la pestaña "*Filters*" se pueden aplicar diferentes modificaciones del filtrado de variantes según se desee. Estos filtros quedarán guardados en el análisis.
- En la columna "*Category*", cada variante puede ser categorizada en cinco niveles de patogenicidad por el propio usuario. El histórico de estas clasificaciones queda almacenado para el análisis de futuras muestras.
- En la columna "*Actions*", seleccionando la opción IGV, se puede visualizar la secuencia de cada variante.
- Durante el análisis bioinformático, se lleva a cabo el cálculo de la frecuencia alélica de cada variante encontrada dentro de la población de muestras analizadas por el usuario con esta herramienta. Dichos cálculos aparecerán en la pantalla de análisis de variantes en dos columnas:
    - Frq Own: Frecuencia alélica de la variante en las muestras incluidas en las base de datos del usuario.
    - Frac Frec Own: Fracción entre el número de veces que aparece la variante y el número de muestras totales incluidas en la base de datos del usuario.
- Es posible generar un archivo de las variantes seleccionadas para cada muestra, ya sea como csv o como informe en pdf. Estos informes permanecerán almacenados junto con el resto de la información asociada a cada muestra.

En caso de requerir información adicional sobre el manejo de la herramienta de análisis bioinformático, puede acceder al manual de DataGenomics a través del enlace http://www.imegen.es/datagenomics.

8.4 Análisis de grandes reordenamientos (CNVs)

El análisis de grandes reordenamientos o CNVs a partir de datos de secuencia NGS, consiste en una correlación entre el número de lecturas normalizadas de una determinada región con respecto al número de copias de ADN para dicha región. Por lo tanto, dado que el número de lecturas debe ser normalizado entre diferentes muestras, cualquier variabilidad entre muestras causará dificultad en la identificación de las CNV.

Debido a los requisitos inherentes a la técnica, es necesario 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 PCR sean homogéneas y que el proceso de PCR se encuentre en su fase lineal, para ello la amplificación se debe llevar a cabo de manera simultánea en un mismo termociclador 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 ADNs analizados hayan sido extraídos siguiendo los mismos protocolos de extracción y desde el mismo tipo de material biológico (sangre, saliva, etc).
3. Es necesario tener un número suficiente de muestras para el análisis. **Importante:** Para llevar a cabo un correcto análisis de CNVs se deben realizar tandas de al menos 10 muestras.
4. Si el mismo tipo de CNV se encuentra en varias muestras, es posible que el software de análisis no lleve a cabo una correcta normalización. Para evitarlo, se recomienda no poner más de un 15% de muestras con la misma CNV (sospecha) en una tanda de análisis. Esto puede ocurrir, por ejemplo, en casos familiares.

Seleccionando el botón "CNV analysis" se accederá a la aplicación desarrollada para análisis de CNVs, donde se podrá elegir de entre todas las muestras incluídas en un run de secuenciación, las que se quieren incluír en el análisis de CNVs.

La aplicación de CNVs analiza los exones codificantes de *BRCA1* (2-23) y *BRCA2* (2-27).

La numeración exónica empleada para *BRCA1*, procede de la secuencia de referencia en NCBI NG_005905.2, no de la tradicional, en la que no está presente el exón 4.

Todos los exones pertenecen a la transcripción canónica NM_007294, que representa la transcripción más abundante, que codifica la proteína de longitud completa, excepto el exón 13*,

que pertenece a la transcripción NM_007300.

Los exones *BRCA2* pertenecen a la transcripción canónica NM_000059, que codifica la proteína de longitud completa.

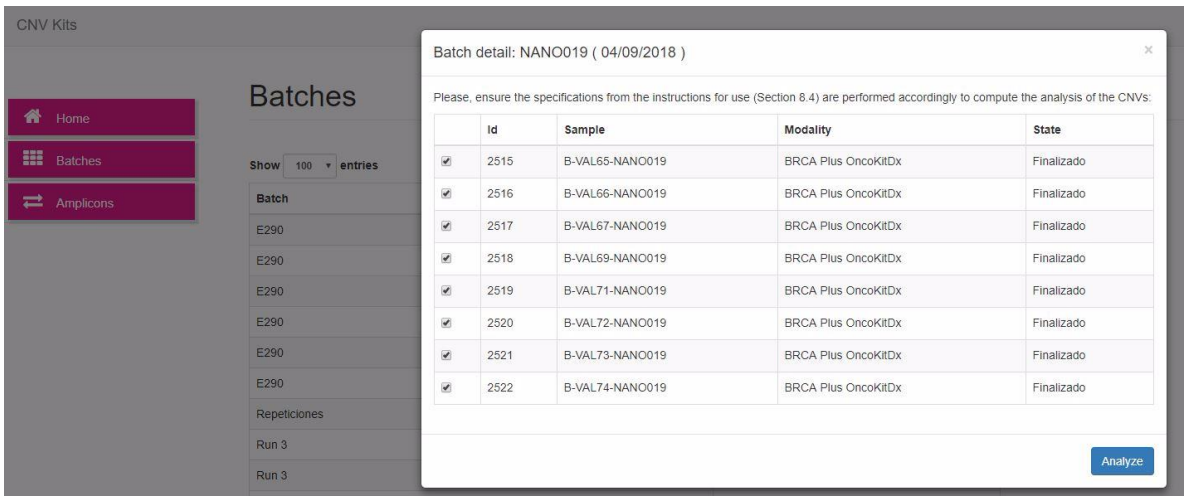


Figura 6: Muestras seleccionadas para el análisis de CNVs.

Pulsando el botón "*Analyse selected*" se podrá acceder a una pantalla donde se mostrará un gráfico y una tabla con los relultados del análisis.

Dentro de esta pantalla es posible seleccionar el gen (*BRCA1* o *BRCA2*), y ver dos tipos de resultados de cada gen:

- Análisis realizado por exón. Debido a que la mayoría de exones poseen más de un amplicón, este resultado es el más fiable.
- Análisis realizado por amplicón. Existen una serie de eventos que pueden modificar la amplificación de un fragmento génico, como "*allelic dropout*" o inserciones de elementos ALU (ejemplos en Figura 7). Mediante esta información adicional al análisis anterior, el usuario podrá evaluar si la amplificación de un fragmento no ha funcionado correctamente y si requiere una investigación posterior. Accionando el nombre del amplicón, aparece una ventana emergente con el número de exón y las coordenadas genómicas.

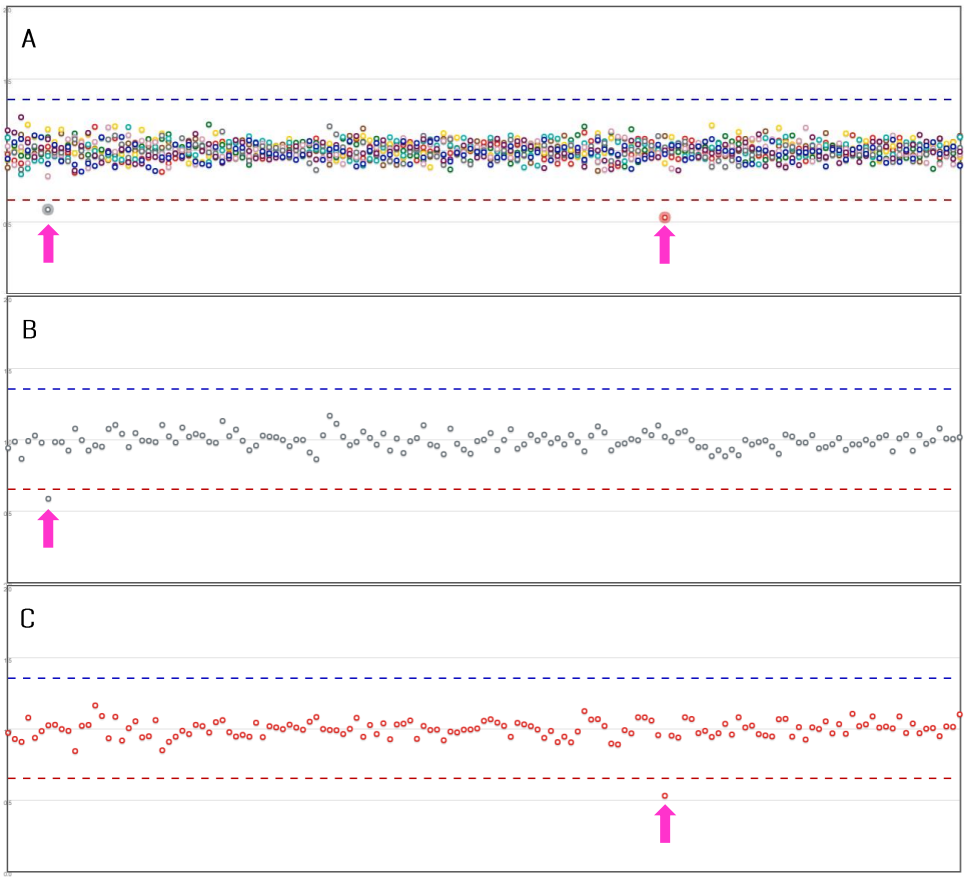


Figura 7: Ejemplo de dos *allelic dropout* visibles medante el análisis por amplicones. **A.** Vista general. **B.** Allelic dropout como un efecto de c.156_157insALU en el exón 3 de *BRCA2*. **C.** Allelic dropout como efecto de una mutación (deleción de 1 pb) bajo un cebador en el exon 14 de *BRCA2*.

Asumiendo que el número de copias normal de una secuencia es dos, el valor índice ideal para el genotipo normal será 1, para una deleción será 0.5 y para una duplicación será 1.5.

El gráfico muestra dos límites, uno inferior (líneas rojas) y uno superior (líneas azules). Cuando en una muestra se obtengan valores fuera de estos límites, será indicativo de una duplicación o deleción en heterozigosis. En las tablas de resultados de amplicón y exón, los valores aparecerán en diferentes colores, negro para resultados normales, rojo para deleción o azul para duplicación.

Accionando el nombre de cada muestra, aparecerán sólo los valores asociados a dicha muestra.

A continuación se muestra una figura como ejemplo de deleciones y duplicaciones en el gen *BRCA1* observadas con el análisis por exones.

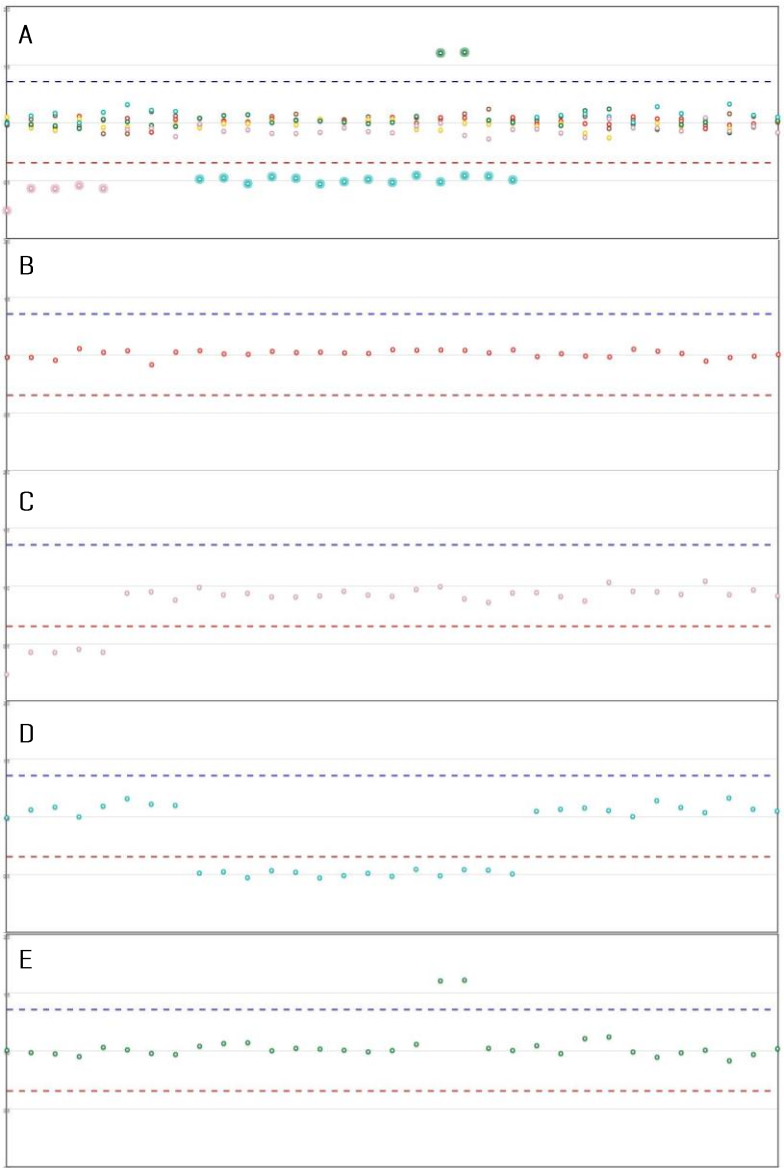


Figura 8: Ejemplo de dos muestras con deleción (puntos rosas y azules) y una muestra con duplicación (puntos verdes). A. Vista general, B. Muestra normal, C. Deleción de los exones 1 al 6, D. Deleción de los exones 10 al 14, E. Duplicación de los exones 14 a 16.

En muestras con una baja calidad del ADN, o debido a problemas durante la reacción de PCR, el análisis de CNVs puede mostrar deleciones y duplicaciones simultáneas. En estos casos, imegen recomienda descartar las muestras problemáticas y analizar el run de CNVs nuevamente.

Como efecto de la amplificación en multiplex, muestras con grandes deleciones o duplicaciones en alguno de los genes analizados puede presentar valores alterados en el otro gen.

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

8.5 Análisis de farmacogenética

El genotipo de los polimorfismos implicados en el metabolismo de los quimioterapéuticos usualmente indicados para el tratamiento del cáncer de mama y ovario puede ser descargado como informe a través de la pestaña "*Orders*", así como el riesgo asociado a cada alelo.

9. Troubleshooting

A continuación, se enumeran los posibles resultados no esperados a lo largo del protocolo de amplificación y secuenciación de las dianas analizadas con el **BRCA Plus OncoKitDx**.

- **Concentración excesivamente baja de las librerías:** Concentraciones inferiores a 10 ng/µL pueden deberse a un fallo en el protocolo de amplificación, o en la purificación de las librerías. En este caso se recomienda analizar la librería con Tape Station 2200, utilizando los kits comerciales High Sensitivity D1000 reagments (Ref:5067-5585) y High Sensitivity D1000 ScreenTape (Ref:5067-5584) de Agilent Technologies.
    - Si el resultado se asemeja al que se muestra en la Figura 1, es decir, aparece un único pico que se corresponde aproximadamente a un tamaño medio de 300 pb, se puede continuar con la secuenciación.
    - Si en lugar de un único pico de 300 pb aparecen varios, revise los diferentes pasos del protocolo de amplificación y purificación.
- **Densidad de cluster diferente a la esperada:** En este caso se recomienda revisar la cuantificación de las librerías y el protocolo de generación del pool de librerías previo a la secuenciación.
- **La muestra no ha pasado los controles de calidad establecidos por la herramienta bioinformática**: En estos casos se recomienda analizar las librerías con Tape Station 2200.
    - Si el resultado se asemeja al obtenido en la Figura 1 se aconseja revisar el protocolo de desnaturalización y carga en el secuenciador.
    - Si en lugar de un único pico de 300 pb aparecen varios, revise los diferentes pasos del protocolo de amplificación y purificación.
- **Errores en los STIDs:** En caso de usar los reactivos de trazabilidad de las muestras proporcionados por imegen es posible que el STID no coincida con el esperado. En este caso revise que los STIDs especificados en la Sample Sheet son los correctos.
- **Problemas de cobertura no uniforme:** En este caso se recomienda revisar los ficheros Bam de las muestras afectadas. Una muestra sin problemas de cobertura debe tener un patrón similar al mostrado en la Figura 9, A. Si por el contrario se observa un patrón similar al mostrado en la Figura 9, B, se recomienda revisar el protocolo de amplificación de la primera PCR, así como las purificaciones de los productos de PCR.

Figura 9. Cobertura del exón 11 de BRCA2. A Patrón correcto de cobertura. B Patrón incorrecto de cobertura.

- **Problemas en el análisis de CNVs:** En muestras con una baja calidad del ADN, o debido a problemas durante la reacción de PCR, el análisis de CNVs puede mostrar deleciones y duplicaciones simultáneas. En estos casos, imegen recomienda descartar las muestras problemáticas y analizar el run de CNVs nuevamente. La Figura 10 muestra un ejemplo de una muestra con baja calidad del ADN (B) y una muestra normal (A).

Figura 10. Análisis por amplicones del gen *BRCA2*. A Ejemplo de una muestra normal. B Ejemplo de una muestra con baja calidad del ADN.

Como efecto de la amplificación en multiplex, muestras con grandes deleciones o duplicaciones en alguno de los genes analizados puede presentar valores alterados en el otro gen (ver Figura 11).

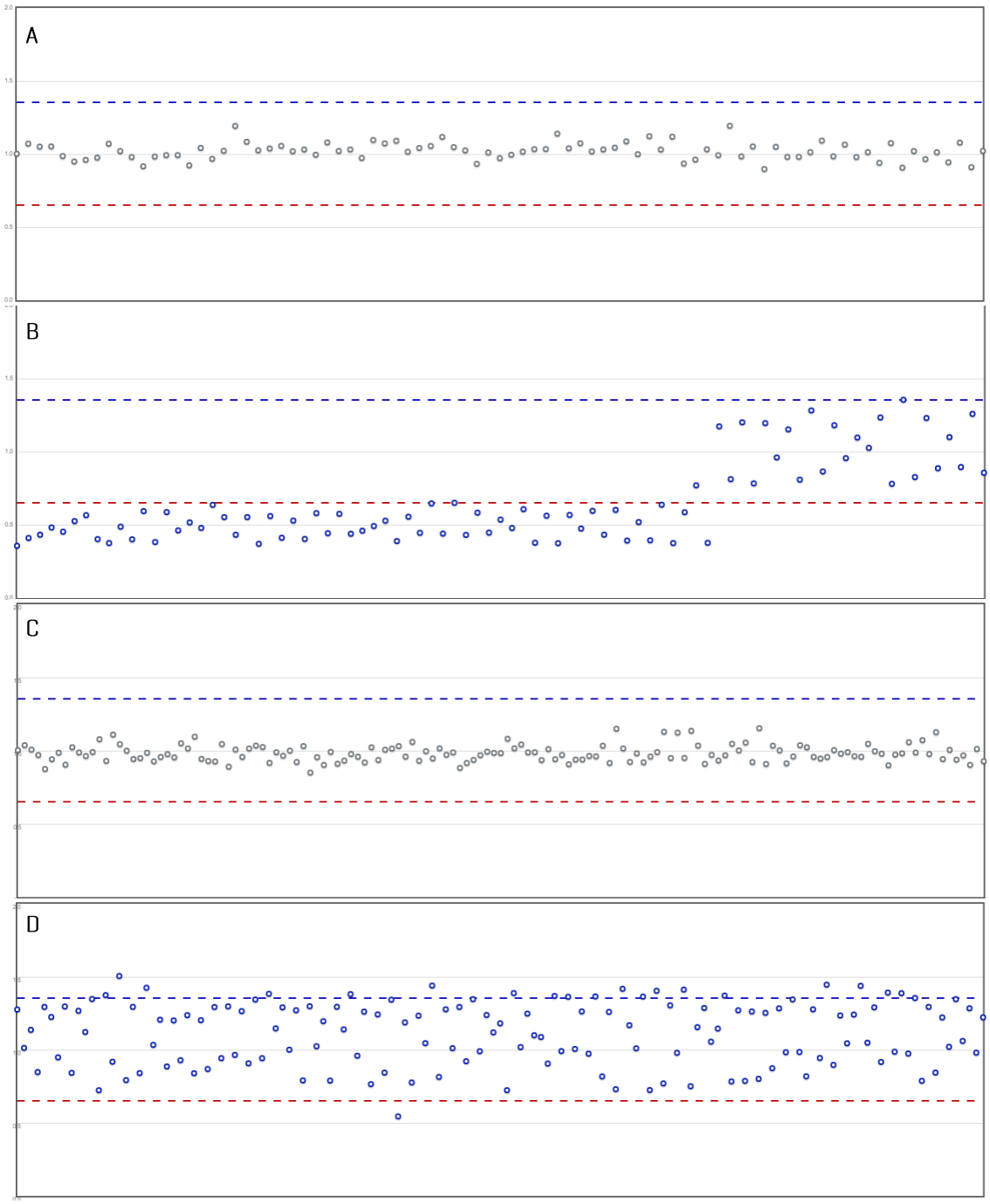


Figura 11. A Ejemplo de una muestra normal. B Muestra con una gran deleción en el *BRCA1*. C y D patron de las mismas muestras en el gen *BRCA2*.

10. Limitaciones

10.1 Equipos

BRCA Plus OncoKitDx ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR:

- SimpliAmp Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific)
- GeneAmp PCR System 9700 (ThermoFisher Scientific)

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

BRCA Plus OncoKitDx ha sido validado usando la siguiente plataforma de secuenciación masiva:

- MiSeq 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 MiSeq System, la concentración final de las librerías tendrá que ajustarse a las especificaciones de los protocolos de dichas plataformas.

10.2 Reactivos

BRCA 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 nuestro servicio técnico.

10.3 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.