

CE IVD

Bringing genomics to health



## Instrucciones de uso

### Hereditary OncoKitDx





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

Rev. 8. 12/03/2020



Página 1 de 43

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 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 d	Modificaciones de las Instrucciones de Uso (IFU)				
Versión: 03	Actualización de la información del apartado 8 en relación al software de				
	análisis.				
Versión: 04	Actualización de la información del apartado 8 en relación a la gestión de				
	solicitudes y al filtrado de variantes del software de análisis.				
Versión: 05	Especificación de los parámetros de calidad en el apartado 7, ajuste de				
	algunas de las recomendaciones del protocolo y ampliación del apartado 10.				
Versión: 06	Actualización de los apartados 5, 7 y 8.				
Versión: 07	Cambio del material fungible empleado, apartado 5 y ajuste del p-valor				
	apartado 8.3				
Versión: 08	Adición de una advertencia en apartado 4, de un apartado (10.4) y corrección				
	de un error (cantidad de ADN de partida) en apartado 3.				

## illiilii imegen

### Índice

1.	Información general	4
2.	Uso previsto	6
3.	Características técnicas	9
4.	Advertencias y precauciones de seguridad	10
5.	Contenido y condiciones de almacenamiento del kit	11
6.	Equipos, reactivos y materiales no suministrados	14
7.	Protocolo de ensayo	16
	7.1 Preparación de las librerías	16
	7.2 Control de calidad de las librerías	22
	7.3 Captura de las regiones de interés de las librerías	23
	7.4 Validación y cuantificación de la librería	29
	7.5 Generación de la Sample Sheet	30
	7.6 Desnaturalización y carga de las librerías	32
8.	Análisis de los resultados	33
	8.1 Solicitud de análisis	33
	8.2 Gestión de solicitudes	34
	8.3 Análisis de grandes reordenamientos (CNVs)	35
	8.4 Análisis de ALU o grandes inserciones	37
	8.5 Filtrado de variantes	37
9.	Troubleshooting	40
10.	Limitaciones	42
	10.1 Analíticas	42
	10.2 Equipos	42
	10.4 Plataforma de análisis bioinformático	43
	10.5 Estabilidad del producto	43

### 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

- Clin. Transl. Oncol. (2015) 17:956–961. DOI 10.1007/s12094-015-1435-3
- J. Natl. Compr. Canc. Netw. 2017; 15(1):9–20.
- ACOG Practice Bulletin: Clinical management guidelines for obstetrician–gynecologists; VOL. 130, no. 3, September 2017.
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal. Version 3.2017- October 10, 2017.
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Melanoma. Version 2. 2018- January 19, 2018.
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Pancreatic Adenocarcinoma. Version 1.2018-April 27, 2018.

## illiilii imegen

onco genomics	Hereditary OncoKitDx
1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	
- Dilución y cuantificación de la muestra. - Fragmentación enzimática de 10 ng de ADN genómico.	
SAMPLE TRACKING	
2. LIGACIÓN DE ADAPTADORES DE SECUENCIACIÓN	C 2h
<ul> <li>Reparación de extremos y ligación de adaptadores.</li> <li>Purificación de los fragmentos unidos a los adaptadores.</li> <li>Amplificación universal de las librerías por PCR: unión de index y adaptadores de secuenciación por PCR.</li> </ul>	
CONTROL DE CALIDAD DE LAS LIBRERÍAS	×
3. HIBRIDACIÓN Y CAPTURA	C Rb
<ul> <li>Hibridación de las sondas biotiniladas a las regiones de interés.</li> <li>Captura de las sondas con baads de estreptavidina.</li> <li>Purificación de los fragmentos de ADN capturados.</li> </ul>	
4. ENRIQUECIMIENTO DE LAS LIBRERÍAS	C 1h
<ul> <li>Amplificación post-captura mediante PCR para el enriquecimiento de las librerías.</li> <li>Purificación de los productos de PCR.</li> </ul>	
CONTROL DE CALIDAD DE LAS LIBRERÍAS	
5. SECUENCIACIÓN MASIVA	© 19h/ 24 h
- Secuenciación de las librerías con plataformas de Illumina.	
6, ANALISIS BIOINFORMATICO	
<ul> <li>Pipeline de análisis diseñado especialmente para Hereditary OncoKitDx, a través de la plataforma Datagenomics.</li> </ul>	data genomics

### 2. Uso previsto

Hereditary OncoKitDx ha sido diseñado para analizar las secuencias de las regiones codificantes de 50 genes (RAD51C, RAD51D, XRCC2, STK11, TP53, PALB2, BRCA1, BRCA2, PTEN, CDH1, ATM, BARD1, CHEK2, NBN, MRE11A, RAD50, MLH1, MSH2, MSH6, EPCAM, PMS2, BRIP1, BMPR1A, APC, MUTYH, SMAD4, POLD1, POLE, MLH3, MSH3, NTHL1, CDKN2A, MET, CDK4, FH, MEN1, RET, SDHB, SDHC, SDHD, SDHA, SDHAF2, VHL, FAM175A (ABRAXAS1), NF1, PIK3CA, RB1, KIF1B, MAX, TMEM127) que han sido 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 (NEM), feocromocitoma, paraganglioma y retinoblastoma). Para ello se partirá de muestras de ADN genómico procedentes de sangre o saliva y el análisis se realizará mediante captura de las regiones de interés con sondas de hibridación y posterior secuenciación masiva de alto rendimiento (NGS).

Los resultados obtenidos en este ensayo proporcionarán al clínico las variantes de las regiones codificantes de los 50 genes incluidos en el panel. Dicha información determinará la predisposición del paciente a padecer cáncer hereditario.

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

### illiilii imegen

A continuación, se muestra la relación entre los genes seleccionados en este kit y los principales tipos de cáncer con los que se asocian.



	Mama	Ovario	Útero	Colorrectal	Melanoma	Pancreático	Gástrico	Próstata	NEM	Feocromocitoma	Paraganglioma	Retinoblastoma	Renal
POLD1													
POLE													
PTEN													
RAD50													
RAD51C													
RAD51D													
RB1													
RET													
SDHA													
SDHAF2													
SDHB													
SDHC													
SDHD													
SMAD4													
STK11													
TMEM127													
ТР53													
VHL													
XRCC2													

Riesgo alto o moderado de desarrollar cáncer si existe un cambio patogénico en el gen, según las guías NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology.

Riesgo bajo de desarrollar cáncer si existe un cambio patogénico en el gen, según las guías NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology.

Evidencias insuficientes, pero algunos estudios relacionan el gen con el tipo de cáncer indicado.

### 3. Características técnicas

Este kit ha sido validado utilizando muestras de ADN de referencia y muestras de pacientes previamente genotipadas con otras tecnologías. En dicha validación se ha verificado que se detectan las variantes presentes en los genes seleccionados (ver apartado anterior).

El kit permite la detección tanto de SNVs, INDELs y CNVs, así como el análisis de inserciones ALU y otras grandes inserciones.

Especificidades técnicas:

- Tipo de muestra: Sangre o saliva.
- Cantidad de ADN de partida: 20-26 ng.
- Cobertura: 99.5% de las bases cubiertas a una profundidad de 50X.
- Uniformidad: 99.2% de las bases cubiertas a >20% de la media de cobertura y 90.0% de las bases cubiertas a >50% de la media de cobertura.
- Sensibilidad: >99.9%
- Especificidad: >99.9%

Hereditary 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 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 y 4 reacciones de captura, cada una con un pool de 12 librerías. La relación de reactivos incluidos en el kit es la siguiente:

- <u>Fragmentation Buffer y Fragmentation Enzyme</u>: Tampón y enzima necesarios para fragmentar y reparar el ADN con el objetivo de permitir la ligación de los adaptadores necesarios para la secuenciación.
- <u>Ligation Master Mix, Ligation Enhancer y Ligase</u>: Tampón enhancer que interacciona con la ligasa para favorecer la reacción de ligación y enzima ligasa que lleva a cabo la unión de los fragmentos a los adaptadores.
- <u>Adaptors</u>: Los adaptadores son secuencias específicas de ADN que se unen a los extremos de los fragmentos de ADN y permiten llevar a cabo la unión de estructuras que participan en la secuenciación (índex y adaptadores de secuenciación).
- Index: Oligonucleótidos con una secuencia única de 6 nucleótidos compatible con los adaptadores de Illumina. Son necesarios para marcar las librerías de cada muestra dando lugar a una combinación única, junto con el Universal Index, que permitirá su análisis tras la secuenciación. El kit incluye los index necesarios para que se puedan secuenciar 24 muestras en un mismo run.
- <u>Universal Index</u>: Oligonucleótido que se unirá a todos los fragmentos de ADN de todas las muestras.
- PCR Master Mix: Master mix general de PCR con las cantidades de enzima, nucleótidos, MgCl<sub>2</sub> y tampón necesarios para llevar a cabo las reacciones en las que se añaden los Index a los fragmentos de ADN.
- <u>Cot-1 DNA</u>: Secuencias de ADN de 50-300 pb que contienen regiones complementarias a Alu o Kpn, uniéndose a ellas y evitando que interfieran en el proceso de captura.

### illilii imegen

- <u>Blockers</u>: Oligonucleótidos que se unen complementariamente a la secuencia de los adaptadores de la librería para reducir la captura de regiones que no son de interés durante el enriquecimiento de la librería.
- Probes: Oligonucleótidos sintéticos biotinilados complementarios a distintas regiones de los 50 genes de interés que permiten la hibridación con dichas zonas y posterior captura mediante beads de estreptavidina debido a la unión de las moléculas biotina-estreptavidina.
- Hybridization Buffer y Hybridization Buffer Enhancer: Tampón y molécula potenciadora de la hibridación de las regiones de interés con las sondas.
- Streptavidin Beads: Partículas magnéticas unidas a moléculas de streptavidina que permiten la captura de los fragmentos de ADN unidos a sondas de captura biotiniladas.
- Beads Wash Buffer y Wash Buffer I-IV: Tampones de lavado que permiten el lavado de las partículas magnéticas unidas a estreptavidina y de los diferentes reactivos que participan en el proceso de captura, así como el lavado de los fragmentos de ADN que no han sido capturados por las partículas de estreptavidina.
- Enrichment PCR Master Mix: Master mix general de PCR con las cantidades de enzima, nucleótidos, MgCl<sub>2</sub> y tampón necesarios para llevar a cabo la reacción de amplificación de los fragmentos capturados.
- <u>Amplification Primer Cocktail</u>: Cebadores complementarios a los adaptadores de Illumina que permiten la amplificación de los fragmentos capturados.
- <u>Elution Buffer</u>: Tampón utilizado en distintos pasos del protocolo para eluir el ADN.

## illiilii imegen

A continuación, se muestran listados los componentes del kit:

Reactivos	Color del tubo	Cantidad	Conservación
Fragmentation Buffer	Disco verde	520 µL	-20°C
Fragmentation Enzyme	Disco blanco	140 µL	-20°C
Ligation Master Mix	Disco negro	1750 µL	-20°C
Ligation Enhancer	Disco amarillo	58 µL	-20°C
Adaptors	Disco morado	40 µL	-20°C
Ligase	Disco blanco	170 µL	-20°C
Index	Tapón azul	24 x 13 µL	-20°C
Universal Index	Tapón rojo	300 µL	-20°C
PCR Master Mix	Disco blanco	1400 µL	-20°C
Cot1- DNA	Disco amarillo	25 µL	-20°C
Blockers	Disco morado	10 µL	-20°C
Probes	Disco negro	20 µL	-20°C
Hybridization Buffer	Disco verde	115 µL	-20°C
Hybridization Buffer Enhancer	Disco amarillo	35 µL	-20°C
Beads Wash Buffer	Disco azul	1000 µL	-20°C
Wash Buffer I	Disco azul	125 µL	-20°C
Wash Buffer II	Disco azul	170 µL	-20°C
Wash Buffer III	Disco azul	80 µL	-20°C
Wash Buffer IV	Disco azul	90 μL	-20°C
Streptavidin Beads	Tapón negro	240 µL	4°C
Enrichment PCR Master Mix	Disco blanco	120 µL	-20°C
Amplification Primer Cocktail	Disco negro	15 µL	-20°C
Elution Buffer (EB)	Disco verde	2 x 1600 µL	4°C

# 6. Equipos, reactivos y materiales no suministrados

#### Equipos:

- Termociclador con tapa con temperatura regulable
- Centrífuga de vacío (Recomendado: SpeedVac System; ThermoFisher)
- Micropipetas de 10 μL, 20 μL, 200 μL y 1000 μL
- Vortex
- Centrífuga
- Soporte imantado para tubos de 1.5mL
- Baño de agua
- Fluorímetro (Recomendado: Qubit; ThermoFisher)
- Espectrofotómetro (Recomendado Nanodrop; ThermoFisher)
- Secuenciador NGS (Illumina)
- Analizador de fragmentos (Recomendado: TapeStation System de Agilent Technologies)

#### **Reactivos:**

- Agentcourt<sup>®</sup> AMPure<sup>®</sup> XP beads (cat. no. A63880, A63881 o A63882; Beckman Coulter Genomics)
- Etanol absoluto
- Agua libre de nucleasas
- Recomendado: Qubit dsDNA BR Assay kit (cat. no. Q32853; Invitrogen) y 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)
- Analizador de fragmentos. Opcional: TapeStation D1000 Reagents (cat. no. 5067-5583; Agilent)
   y High Sensitivity D1000 Reagments (cat. no. 5067-5585; Agilent)

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

#### Materiales:

- Puntas de pipetas con filtro *low-bindinging* (10 μL, 20 μL, 200 μL y 1000 μL)
- Tubos estériles de 0.2 mL y 1.5 mL
- Tubos estériles *low-bindinging* de 0.2 mL y 1.5 mL
- Guantes de látex
- Qubit (recomendado): Qubit<sup>™</sup> assay tubes (Ref: Q32856; Invitrogen)
- Fungible del analizador de fragmentos. Opcional: TapeStation D1000 ScreenTape (Ref:5067-5582; Agilent) y High Sensitivity D1000 ScreenTape (cat. no. 5067-5584; Agilent)
  - NOTA Hereditary OncoKitDx está preparado para usarse en combinación con los kits imegen-Sample tracking C y D (REF: IMG-318 / IMG-319), 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

#### 7.1 Preparación de las librerías del Hereditary OncoKitDx

La calidad de las muestras de ADN es crítica para la correcta preparación de las librerías. Por este motivo, realizaremos varias comprobaciones de cada muestra de ADN. Para ello, en este primer paso se realizan varias comprobaciones mediante la cuantificación del ADN.

#### 7.1.1 Preparación de las muestras de ADN

- 1. Descongelar a temperatura ambiente las muestras de ADN genómico.
- 2. Agitar en vortex y cuantificar las muestras de ADN genómico con un equipo espectrofotométrico como Nanodrop o fluorimétrico como Qubit.
- Diluir cada muestra de ADN a 25 ng/μL con agua libre de nucleasas en un volumen final de 50 μL.
   Opcional: Si se va a utilizar el sistema integrado de trazabilidad de Imegen (Sample tracking

**Opcional:** Si se va a utilizar el sistema integrado de trazabilidad de imegen (*Sample tracking kit* C y D; Ref. IMG-318, IMG-319), realizar el paso 3, sustituyendo 2.5  $\mu$ L de agua, por la misma cantidad de uno de los doce reactivos de seguimiento de la muestra, *Sample tracking Kit* C o D.

- 4. Agitar en vortex y cuantificar de nuevo cada muestra con un equipo espectrofotométrico, como Nanodrop o fluorimétrico como Qubit.
- 5. Diluir la muestra de ADN a 2 ng/ $\mu$ L con agua libre de nucleasas en un volumen total de 50 $\mu$ L.
- 6. Agitar en vortex y cuantificar de nuevo cada muestra con un equipo fluorimétrico, como Qubit.
- 7. Diluir la muestra de ADN a 0.8-1 ng/ $\mu$ L con agua libre de nucleasas en un volumen total de 27  $\mu$ L en un tubo de 0.2 mL.

#### 7.1.2 Preparación de las reacciones de fragmentación

Reactivos a utilizar en este paso:

Reactivo	Color del tubo	Conservación
Fragmentation Buffer	Disco verde	-20ºC
Fragmentation Enzyme	Disco blanco	-20ºC

1. Descongelar en hielo los reactivos *Fragmentation Buffer* y *Fragmentation Enzyme*.

### illilii imegen

2. Preparar, en un tubo de 1.5 mL, el master mix de fragmentación con las siguientes cantidades, agitándolos previamente en vortex.

	Volumen por	12	24	48
Reactivo	muestra	muestras	muestras	muestras
Fragmentation Buffer	7 μL	105 μL	210 μL	420 μL
Fragmentation Enzyme*	2 μL	30 µL	60 µL	120 μL

\*Nota: Este reactivo es altamente viscoso, pipetear muy despacio para evitar la pérdida de reactivo

- 3. Dispensar 9 μL del master mix de fragmentación a cada tubo de 0.2 mL y añadir en cada uno de ellos 26 μL del correspondiente ADN a una concentración 0.8-1 ng/μL.
- 4. Agitar en vortex durante 5 segundos y dar un spin a las reacciones de fragmentación.
- 5. Colocar los tubos en el termociclador y ejecutar el siguiente programa de fragmentación:

Tapa precalentada a 75ºC.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
37°C	20 minutos	1
65°C	30 minutos	1
4°C	œ	1

Tabla 1. Programa de fragmentación óptimo para SimpliAmp™ Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific)

#### 7.1.3 Ligación de los adaptadores

Reactivos a utilizar en este paso:

Reactivo	Color del tubo	Conservación
Ligation Master Mix	Disco negro	-20ºC
Ligation Enhancer	Disco amarillo	-20ºC
Adaptors	Disco morado	-20ºC
Ligase	Disco blanco	-20ºC
Elution Buffer	Disco verde	4ºC

- 1. Descongelar a temperatura ambiente los reactivos *Ligation Master Mix, Ligation Enhancer, Adaptors* y *Ligase.*
- 2. Preparar una dilución 1:10 del reactivo *Adaptors* utilizando el *Elution Buffer*. Agitar en vortex y dar un spin. Añadir 2 μl de esta dilución a cada tubo de 0.2 mL con la muestra fragmentada.
- 3. Preparar en un tubo de 1.5 mL el master mix de ligación:

	Volumen por	12	24	48
Reactivo	muestra	muestras	muestras	muestras
Ligation Master Mix*	30 µL	396 μL	792 μL	1584 μL
Ligation Enhancer	1 µL	13.2 μL	26.4 μL	52.8 μL

\*Nota: Se recomienda comprobar la correcta homogeneización del Ligation Master Mix con el resto de reactivos, ya que se trata de un reactivo muy viscoso. En el caso de que aparezcan pequeñas burbujas, estás no interferirán en el proceso.

- 4. Añadir a los tubos de 0.2 mL con las muestras, 31 µL del master mix de ligación.
- 5. Pipetear 10 veces arriba y abajo todo el volumen de la mezcla para homogenizar bien los reactivos y dar un spin.
- 6. Incubar a 20°C durante 15 minutos en un termociclador con la opción de precalentamiento de la tapa desactivada.
- 7. Añadir 3 µL de *Ligase* a los tubos de 0.2 mL y agitar en vortex.
- 8. Incubar a 37<sup>o</sup>C durante 15 minutos en un termociclador con la tapa precalentada a 47<sup>o</sup>C.

Es posible detener el protocolo en este punto conservando las muestras a -20ºC overnight.

#### 7.1.4 Purificación de los fragmentos de ADN unidos a los adaptadores

Reactivos a utilizar en este paso:

Reactivo	Color del tubo	Conservación
Elution Buffer	Disco verde	4ºC

Para este proceso es necesario atemperar los reactivos AMPure XP *Beads* y *Elution Buffer*, 30 minutos antes de utilizarlos y preparar 440 µL de etanol al 80% por reacción. En caso de haber congelado las muestras al finalizar el paso anterior, descongelar las muestras para continuar con el protocolo.

- Dar un spin y transferir todo el volumen de las reacciones de ligación (71 μL) a tubos de 1.5 mL.
- 2. Añadir 57 μL de AMPure XP *Beads* y pipetear 10 veces arriba y abajo para homogenizar bien con las muestras.

### illiilii imegen

- 3. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 4. Colocar los tubos en un soporte imantado durante 5 minutos para que las partículas magnéticas se adhieran bien al imán.
- 5. Descartar el sobrenadante.
- 6. Añadir 200 μL de etanol al 80% recién preparado.
- 7. Incubar a temperatura ambiente durante 30 segundos.
- 8. Repetir los pasos 6 y 7 de este protocolo. Retirar todo el volumen de etanol posible.
- 9. Dejar los tubos abiertos a temperatura ambiente durante, no más de 5 minutos, para secar los restos de etanol.
- 10. Añadir 17 μL de *Elution Buffer* a cada tubo de 1.5 mL.
- 11. Retirar los tubos del soporte imantado y resuspender el *pellet* pipeteando 10 veces arriba y abajo.
- 12. Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 13. Colocar los tubos en el soporte imantado durante 5 minutos y transferir 15  $\mu$ L del sobrenadante a un tubo nuevo de 0.2 mL.

Es posible detener el protocolo en este punto conservando las muestras a -20ºC

#### 7.1.5 Amplificación por PCR y unión de los index

Reactivos a utilizar en este paso:

Reactivo	Color del tubo	Conservación
PCR Master Mix	Disco blanco	-20ºC
Index	Tapón azul	-20ºC
Universal Index	Tapón rojo	-20ºC

1. Descongelar los reactivos: PCR *Master Mix, Index* (uno distinto por cada muestra) y *Universal Index* y agitar en vortex. Se recomienda utilizar el pool A o el pool B de *Index* que aparecen a continuación:

Pool A		Pool B	
Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
Index-AD002	CGATGT	Index-AD001	ATCACG
Index-AD003	TTAGGC	Index-AD009	GATCAG
Index-AD004	TGACCA	Index-AD011	GGCTAC
Index-AD005	ACAGTG	Index-AD012	CTTGTA
Index-AD006	GCCAAT	Index-AD013	AGTCAA
Index-AD007	CAGATC	Index-AD014	AGTTCC
Index-AD008	ACTTGA	Index-AD019	GTGAAA
Index-AD010	TAGCTT	Index-AD020	GTGGCC
Index-AD015	ATGTCA	Index-AD021	GTTTCG
Index-AD016	CCGTCC	Index-AD023	GAGTGG
Index-AD018	GTCCGC	Index-AD025	ACTGAT
Index-AD022	CGTACG	Index-AD027	ATTCCT

Tabla 2. Listado de index

2. Preparar en un tubo de 1.5 mL el master mix Pre-PCR:

	Volumen por	12	24	48
Reactivo	muestra	muestras	muestras	muestras
PCR master mix	25 μL	330 μL	660 μL	1320 μL
Universal Index	5 μL	66 µL	132 μL	264 μL

- 3. Dispensar a cada tubo de 0.2 mL del paso 13 del apartado anterior, 30 μL de master mix Pre-PCR.
- 4. Añadir a los tubos de 0.2 mL, 5 μL de uno de los index (uno distinto para cada muestra).
- 5. Pipetear 10 veces arriba y abajo todo el volumen para homogenizar correctamente los reactivos y dar spin.
- 6. Colocar los tubos en el termociclador y ejecutar el siguiente programa de PCR:

Tapa precalentada a 105ªC.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
98°C	30 segundos	1
98°C	10 segundos	10
65°C	75 segundos	10
65°C	5 minutos	1
4°C	∞	

Tabla 3. Programa de PCR óptimo para SimpliAmp Thermal Cycler (ThermoFisher)

#### 7.1.6 Purificación del producto de PCR

Reactivos a utilizar en este paso:

Reactivo	Color del tubo	Conservación
Elution Buffer	Disco verde	4ºC

Para este proceso es necesario atemperar los reactivos AMPure XP *Beads* y *Elution Buffer* 30 minutos antes de utilizarlos y 440 µL de etanol al 80% por reacción.

- 1. Transferir el volumen total (50 μL) de cada muestra a tubos de 1.5 mL.
- 2. Añadir 45 µL de AMPure XP *Beads* a cada tubo y pipetear arriba y abajo 10 veces.
- 3. Incubar a temperatura ambiente 5 minutos.
- 4. Colocar los tubos en un soporte imantado durante 5 minutos para que las partículas magnéticas se adhieran bien al imán.
- 5. Descartar el sobrenadante.
- 6. Añadir 200 μL de etanol al 80% recién preparado.
- 7. Incubar a temperatura ambiente durante 30 segundos. Descartar el sobrenadante.
- 8. Repetir los pasos 6 y 7 de este protocolo. Retirar todo el volumen de etanol posible.
- 9. Dejar los tubos abiertos a temperatura ambiente durante, no más de 5 minutos, para secar los restos de etanol.
- 10. Añadir 33  $\mu$ L de *Elution Buffer* a cada tubo de 1.5 mL.
- 11. Retirar los tubos del soporte imantado y resuspender el *pellet* pipeteando 10 veces arriba y abajo.
- 12. Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 13. Colocar los tubos en el soporte imantado durante 5 minutos y transferir 30  $\mu$ L del sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 mL.

Es posible detener el protocolo en este punto conservando las muestras a -20ºC

#### 7.2 Control de calidad de las librerías

Para medir la concentración del ADN, se recomienda el uso de un fluorímetro Qubit<sup>R</sup> 2.0, el kit comercial Qubit ds DNA HS Assay kit (Ref: Q32854) y los tubos Qubit<sup>™</sup> assay tubes (Ref: Q32856) de Invitrogen. La concentración esperada es 30-80 ng/µL.

**Opcional:** imegen recomienda comprobar el tamaño de las librerías obtenidas empleando la Tapestation 2200 y los kits comerciales D1000 reagents (Ref: 5067-5583) y D1000 ScreenTape (Ref:5067-5582) de Agilent. Tras el análisis de las muestras con la Tapestation se debe obtener un tamaño de la librería de aproximadamente 260-320 pb, como se muestra en la siguiente imagen. En caso de obtener un tamaño no esperado revise el protocolo o póngase en contacto con el soporte técnico de imegen.



#### 7.3 Captura de las regiones de interés de las librerías

#### 7.3.1 Hibridación de las sondas de captura con las librerías

Reactivos a utilizar en este paso:

Reactivo	Color del tubo	Conservación
Cot1 - DNA	Disco amarillo	-20ºC
Blockers	Disco morado	-20ºC
Hibridization Buffer	Disco Verde	-20ºC
Hibridization Buffer Enhancer	Disco amarillo	-20ºC
Probes	Disco negro	-20ºC

- 1. Descongelar los reactivos Cot-1 DNA y Blockers a temperatura ambiente. Agitar en vortex y dar un spin a cada tubo.
- Hacer un pool con todas las librerías (hasta un máximo de 12). Para ello se debe añadir 500 ng de cada librería a un tubo de 1.5 mL *low-binding*. Por tanto, el volumen a añadir de cada librería dependerá de su concentración, obtenida en el control de calidad de las librerías (apartado 7.2).
- 3. Añadir 5 µl de *Cot-1 DNA* al tubo.
- 4. Añadir 2 µL de *Blockers* al tubo. Agitar en vortex.
- 5. Secar el contenido del tubo con una centrífuga de vacío (recomendamos *SpeedVac* System de ThermoFisher) a 70ªC.

Tras el paso de secado, los tubos pueden permanecer a temperatura ambiente *overnight* o a -20ºC durante periodos de almacenamiento más largos.

- 6. Descongelar los reactivos *Hybridization Buffer*, *Hybridization Buffer Enhancer* y *Probes* a temperatura ambiente. Si el reactivo *Hybridization Buffer* ha precipitado, calentar el tubo a 65°C en el baño de agua y agitarlo intermitentemente hasta que el tampón se haya resuspendido completamente. Este proceso puede durar horas.
- 7. Preparar una mezcla añadiendo las cantidades necesarias de los reactivos que se muestran a continuación a un tubo de 1.5 mL, en función del número de reacciones totales. Se recomienda realizar los cálculos añadiendo un 10% más de cada uno de los reactivos.

Reactivo	Volumen por reacción
Hybridization Buffer	8.5 μL
Hybridization Buffer Enhancer	2.7 μL
Probes	4 μL
Agua libre de nucleasas	1.8 μL

- 8. Dispensar 17 μL a cada tubo con el pellet de ADN (pool de librerías) y pipetear arriba y abajo para homogenizar correctamente la muestra con los reactivos.
- 9. Incubar a temperatura ambiente 5 minutos.
- 10. Agitar en vortex y dar un spin.
- 11. Transferir todo el volumen a un tubo *low-binding* de 0.2 mL y ejecutar el siguiente programa de hibridación en el termociclador:

Tapa precalentada a 100 ºC:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	30 segundos	1
65°C	4 horas	1
65°C	œ	1

Tabla 4. Programa de hibridación óptimo para SimpliAmp Thermal Cycler (ThermoFisher)

#### 7.3.2 Preparación de los buffers de lavado y de las Streptavidin Beads

Reactivos a utilizar en este paso:

Reactivo	Color del tubo	Conservación
Beads Wash Buffer	Disco azul	-20ºC
Wash Buffer I	Disco azul	-20ºC
Wash Buffer II	Disco azul	-20ºC
Wash Buffer III	Disco azul	-20ºC
Wash Buffer IV	Disco azul	-20ºC
Streptavidin Beads	Tubo cristal	4ºC

- 1. Descongelar los tampones de lavado (*Wash buffers*) y el tubo de *Streptavidin beads* a temperatura ambiente.
- 2. Por cada reacción de captura, preparar las cantidades indicadas en la siguiente tabla de cada uno de los tampones de lavado para que estén a una concentración 1X.

	Volumen de tampón	Volumen de agua libre de
Reactivo	concentrado	nucleasas
Beads Wash buffer	160 μL	160 μL
Wash Buffer I*	29 μL	261 μL
Wash Buffer II	34 μL	306 μL
Wash Buffer III	16 μL	144 μL
Wash Buffer IV	16 μL	144 μL

\* Si es necesario, calentar en un baño de agua a 65ºC para resuspender el precipitado.
 Nota: Los reactivos de lavado (1X) son estables durante 4 semanas a temperatura ambiente.

- 3. En un tubo de 1.5 mL *low-binding*, incubar las *Streptavidin beads* (50 μL por reacción de captura) a temperatura ambiente 30 minutos antes de su uso.
- 4. Preparar una mezcla añadiendo las cantidades necesarias de los reactivos que se muestran a continuación a un tubo de 1.5 mL, en función del número de reacciones de captura totales. Se recomienda realizar los cálculos añadiendo un 10% más de cada uno de los reactivos. Esta mezcla se puede conservar a temperatura ambiente junto con los tampones de lavado hasta su uso indicado en el paso 11 de este apartado.

Reactivo	Volumen por reacción
Hybridization Buffer	8.5 μL
Hybridization Buffer Enhancer	2.7 μL
Agua libre de nucleasas	5.8 μL

- 5. Agitar en vortex durante 15 segundos el tubo de *Streptavidin beads* previamente atemperadas.
- 6. Repartir 50 μL de *Streptavidin beads* en tubos *low-binding* nuevos de 1.5 mL, en caso de haber más de una reacción de captura.
- 7. Añadir 100 μL de *Beads Wash Buffer* (1X) al tubo con las partículas magnéticas y pipetear arriba y abajo 10 veces para homogenizar bien los reactivos.
- 8. Colocar el tubo en el soporte imantado para separar completamente las partículas magnéticas del sobrenadante (aproximadamente 1 minuto).
- 9. Descartar el sobrenadante clarificado.
- 10. Realizar los pasos 7-9 de este apartado otras dos veces.
- 11. Añadir al tubo 17  $\mu$ L de la mezcla de reactivos preparada en el paso 4 de este apartado, retirar del soporte imantado para agitar en vortex y dar un spin.

#### 7.3.3 Captura del ADN hibridado con las Streptavidin Beads

- 1. Calentar a 65<sup>o</sup>C en un baño de agua, 120 μL de *Wash Buffer I* y 320 μL de *Wash Buffer II* preparados a 1X en el apartado anterior, almenos 15 minutos antes de su uso.
- 2. Una vez terminado el programa de 4 horas de hibridación, retirar el tubo con el pool de librerías y activar un nuevo programa a 65ºC (con tiempo indefinido) con la tapa precalentada a 70ºC. El programa es necesario para incubar las *beads* con la muestra en el paso 4.
- 3. Transferir 17  $\mu$ L de *beads* de estreptavidina resuspendidas en el paso 11 del apartado anterior al tubo con el pool de librerías y agitar en vortex.
- Incubar en el termociclador a 65ºC durante 45 minutos (con la tapa precalentada a 70ºC, como se indica en el paso 2 de este apartado).
   Nota: El hecho de que la tapa todavía no se haya enfriado suficiente y no esté a 70ºC, no interferirá en el proceso.
- 5. Durante los 45 minutos que durará la incubación, agitar en vortex cada 12 minutos el tubo para mantener las *beads* en suspensión.

#### 7.3.4 Lavado del ADN no capturado por las *Streptavidin Beads*

- Tras los 45 minutos de incubación, retirar el pool de librerías del termociclador y añadir 100 μL de Wash Buffer I (1X) precalentado según las instrucciones del paso 1 del apartado anterior. Pipetear arriba y abajo 10 veces para homogenizar correctamente la muestra con el tampón con cuidado para que no se formen burbujas.
- 2. Transferir todo el volumen a un tubo *low-binding* de 1.5 mL.
- 3. Colocar el tubo en el soporte imantado durante 1 minuto para separar completamente las partículas magnéticas del sobrenadante.
- 4. Descartar el sobrenadante que contiene el ADN que no se ha unido a las partículas magnéticas.
- 5. Retirar el tubo del soporte magnético.
- 6. Añadir 150 μL de *Wash Buffer II* precalentado según las instrucciones del paso 1 del apartado anterior en el tubo de 1.5 mL y pipetear arriba y abajo 10 veces con cuidado, para no crear burbujas.
- 7. Incubar en el baño de agua a 65ºC durante 5 minutos.
- 8. Colocar el tubo en el soporte imantado durante 1 minuto para separar completamente las partículas magnéticas del sobrenadante.
- 9. Descartar el sobrenadante.

### illiilii imegen

- 10. Repetir los pasos 6-9.
- 11. Añadir 150 μL de *Wash Buffer I* (1X) a temperatura ambiente al tubo de 1.5 mL.
- 12. Durante 2 minutos alternar ciclos de 30 segundos de vortex y reposo de la muestra.
- 13. Dar spin a la muestra.
- 14. Colocar el tubo en el soporte imantado durante 1 minuto para separar completamente las partículas magnéticas del sobrenadante.
- 15. Descartar el sobrenadante y retirar el tubo del soporte magnético.
- 16. Añadir 150 μL de Wash Buffer III (1X) a temperatura ambiente al tubo de 1.5 mL.
- 17. Durante 2 minutos alternar ciclos de 30 segundos de vórtex y reposo de la muestra.
- 18. Dar un spin a la muestra.
- 19. Colocar el tubo en el soporte imantado durante 1 minuto para separar completamente las partículas magnéticas del sobrenadante.
- 20. Descartar el sobrenadante.
- 21. Añadir 150 μL de Wash Buffer IV (1X) a temperatura ambiente al tubo de 1.5 mL.
- 22. Durante 2 minutos alternar ciclos de 30 segundos de vortex y reposo de la muestra.
- 23. Dar spin a la muestra.
- 24. Colocar el tubo en el soporte imantado durante 1 minuto para separar completamente las partículas magnéticas del sobrenadante.
- 25. Descartar el sobrenadante y con el tubo todavía en el soporte magnético, retirar, con puntas de pipeta nuevas, todos los restos de *Wash Buffer IV* que hayan podido quedar.
- 26. Retirar el tubo de 1.5 mL del soporte magnético y añadir 20 μL de agua libre de nucleasas. Pipetear arriba y abajo 10 veces para resuspender las partículas magnéticas.

#### 7.3.5 Enriquecimiento post-captura mediante PCR

Reactivos a utilizar en este paso:

Reactivo	Color del tubo	Conservación
Enrichment PCR Master Mix	Disco blanco	-20ºC
Amplification Primer Cocktail	Disco negro	-20ºC

1. Añadir las cantidades necesarias de los reactivos indicados a continuación a un tubo *low-binding* de 0.2 mL:

### illilii imegen

Reactivo	Volumen por reacción
Enrichment PCR Master Mix	25 μL
Amplification Primer Cocktail	1.25 μL
Agua libre de nucleasas	3.75 μL
Partículas magnéticas con el ADN capturado	20 µL

- 2. Agitar en vortex y dar un spin al tubo de 0.2 mL.
- 3. Llevar a cabo las reacciones de amplificación ejecutando el siguiente programa de PCR:

Tapa precalentada a 105ºC.

Temperatura	Tiempo	Ciclos		
98°C	45 segundos	1		
98°C	15 segundos			
60°C	30 segundos	10		
72°C	30 segundos			
72°C	1 minuto	1		
4°C	œ	1		

Tabla 5. Programa de PCR óptimo para SimpliAmp Thermal Cycler (ThermoFisher)

Tras la PCR, los productos pueden permanecer a 4ºC overnight.

#### 7.3.6 Purificación post-captura de los fragmentos de PCR

Reactivos a utilizar en este paso:

Reactivo	Color del tubo	Conservación
Elution Buffer	Disco verde	4ºC

Para este proceso es necesario atemperar los reactivos AMPure XP Beads (75  $\mu$ L por reacción de captura) y Elution Buffer (22  $\mu$ L por reacción de captura) 30 minutos antes de utilizarlos y preparar etanol absoluto al 80% (250  $\mu$ L por muestra).

- 1. Transferir todo el volumen de muestra (50  $\mu$ L) a un tubo *low-binding* de 1.5 mL por cada reacción de PCR.
- 2. Añadir 75 µL de partículas magnéticas al tubo de 1.5 mL.
- 3. Pipetear 10 veces arriba y abajo para homogenizar correctamente las muestras con las partículas magnéticas.
- 4. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

- 5. Colocar el tubo en un soporte imantado durante 2 minutos para que las partículas magnéticas se adhieran bien al imán.
- 6. Retirar el sobrenadante pipeteando con cuidado.
- 7. Añadir 125  $\mu$ L de etanol al 80% e incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
- 8. Retirar el sobrenadante.
- 9. Repetir los pasos 7 y 8.
- Dejar secar los restos de etanol durante 1-3 minutos.
   Nota: Más tiempo de secado podría interferir en el correcto rendimiento del proceso.
- 11. Retirar el tubo del soporte imantado y añadir 22 μL de Elution Buffer agitando vigorosamente con vórtex hasta que la solución partículas magnéticas-Elution Buffer quede homogénea.
- 12. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 13. Colocar el tubo en un soporte imantado durante 2 minutos para que las partículas magnéticas se adhieran bien al imán.
- 14. Transferir 20 μL del producto eluido a un tubo *low-binding* de 1.5 mL nuevo, asegurándose de no transferir partículas magnéticas.

Es posible detener el protocolo en este punto. Los productos de PCR purificados pueden almacenarse a -20ºC un tiempo máximo de 1 semana.

#### 7.4 Validación y cuantificación de la librería

Para medir la concentración del ADN, se recomienda el uso de un fluorímetro Qubit<sup>R</sup> 2.0, el kit comercial Qubit ds DNA HS Assay kit (Ref: Q32854) y los tubos Qubit<sup>™</sup> assay tubes (Ref: Q32856) de Invitrogen. La concentración esperada es 2-5 ng/µL.

**Opcional:** imegen recomienda comprobar el tamaño medio de los fragmentos capturados de las librerías empleando la Tapestation 2200 y los kits comerciales High Sensitivity D1000 Reagments (cat. no. 5067-5585) y High Sensitivity D1000 ScreenTape (cat. no. 5067-5584) de Agilent Technologies. Tras el análisis de las muestras con Tapestation se debe obtener un tamaño medio de los fragmentos próximo a 260-320 pb. En caso de obtener un tamaño no esperado, revise el protocolo o póngase en contacto con el soporte técnico de imegen.



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:

Concentración librerías (nM) = (Concentración 
$$\binom{ng}{\mu L} \cdot \frac{1500}{Tamaño(pb)}$$
)

En caso de no analizar el tamaño medio de los fragmentos en un sistema de electroforesis digital, utilice el tamaño medio de 296 pb para el cálculo de la concentración de las librerías. Este tamaño ha sido calculado durante la validación del **Hereditary OncoKitDx**.

#### 7.5 Generación de la Sample Sheet

La *Sample Sheet,* necesaria para la secuenciación, 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* (o el equipo que se esté empleando).
- 3. Seleccionar Other>FASTQ Only>Next.
- 4. Rellenar para cada ensayo los campos: *Reagent Cartridge Barcode, Library Prep Workflow* (*Truseq DNA Exome Enrichment*), *Index Adapters (TruSeq DNA Single Indexes (A,B)), Index Reads (1 Single), Experiment Name, Investigator Name y Description*. El resto de campos quedarán como en la figura que se muestra a continuación:

inple officer wiz	ard - worknow r o	indificiers	
FASTQ Only Run Settings		FASTQ Only Workflow-Specific Settings	
Reagent Cartridge Barcode*	MS#######-300V2	Custom Primer for Read 1	
Library Prep Workflow	Tru Seq DNA Exome Enrichment	Custom Primer for Index	
Index Adapters	TruSeq DNA Single Indexes (A,B)	Custom Dimension Read 2	
Index Reads	⑦ 0 (None) 1 (Single) 2 (Dual)		
Experiment Name	Hereditary OncoKitDx	Reverse Complement	
Investigator Name	Hereditary OncoKitDx Hereditary OncoKitDx	Vise Adapter Trimming	
Date	02/07/2018	Vise Adapter Trimming Read 2	
Read Type	Paired End     O Single Read		
Cycles Read 1	151 👘		
Cycles Read 2	151		
- required field			

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

5. Seleccionar *Next*.

a da ta al-al-al-an-an-al-al-an-al-

6. En la siguiente pantalla, añadir (seleccionando *Add Blank Row*) una fila por cada muestra incluida en el ensayo. Rellenar los campos de cada muestra:

Nota: El nombre de la muestra no debe contener guiones.

Sample ID*	Sample Name	Plate	Well	Index1 (17)*	17 Sequence	Sample Project	Description
VM_1				AD008-B	ACTTGA		
VM_2				AD006-A	GCCAAT		
VM_3				AD002-A	CGATGT		
VM_4				AD016-A	CCGTCC		
VM_5				AD018-A	GTCCGC		
VM_6				AD007-A	CAGATC		
VM_7				AD005-A	ACAGTG		
VM_8				AD003-B	TTAGGC		
VM_9				AD004-A	TGACCA		
VM_10				AD010-B	TAGCTT		
VM_11				AD022-B	CGTACG		
VM_12				AD015-A	ATGTCA		

Figura 3. Identificación de las muestras incluidas en la Sample Sheet

- 7. Seleccionar la opción *Finish*.
- 8. Aparecerá la opción de guardar la *Sample Sheet* creada. Guardar como .csv.

#### 7.6 Desnaturalización y carga de las librerías

A continuación, se detalla el protocolo de desnaturalización previa a la carga en un secuenciador Illumina MiSeq:

- 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 Micro Kit v2 (300 ciclos). Ref: MS-103-1002) y mantener en frío hasta su uso.
- 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 por Illumina junto con el reactivo).
- 3. Diluir cada librería a una concentración de 4 nM con el reactivo *Elution Buffer*.
- Unir todas las librerías que se vayan a cargar en un mismo run (muestras con distintos Index) 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 un spin.
- 5. Añadir 5  $\mu$ l del pool de librerías a un tubo de 1.5 mL y 5  $\mu$ l de NaOH 0.2N (No suministrado con el kit). Agitar en vortex y dar un spin.
- 6. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 7. Añadir 990 μl de HT1 y agitar empleando vortex. La librería está a 20 pM.
- 8. Mezclar 300  $\mu$ L de la librería a 20 pM y 300  $\mu$ L de HT1. Agitar empleando vortex. La librería está a 10 pM.
- 9. A esta mezcla, añadir 10 µLde PhiX control desnaturalizado y diluido a 12.5 pM.
- 10. Cargar todo el volumen que contiene el tubo de 1,5 mL en el cartucho.

A continuación, se detallan el número de muestras máximo recomendado por run, para garantizar un número mínimo de clusters PF de aproximadamente 350.000 por muestra:

MiSeq Reagents Kit	Nº máximo de muestras
MiSeq Reagents micro Kit v2 (300 ciclos). Ref: MS-103-1002	12
MiSeq Reagents Kit v2 (300 ciclos). Ref: MS-102-2002	48*

Tabla 6. Kit de MiSeq Illumina y número máximo de muestras a analizar con Hereditary OncoKitDx

\*El kit incluye index para analizar 24 muestras, en caso de necesitar analizar 48 en un mismo ensayo de secuenciación, contacte con el servicio técnico de imegen.

Las librerías de **Hereditary OncoKitDx** se pueden cargar junto con otras librerías en el mismo proceso de secuenciación, siempre y cuando estén marcadas con index de 6 nucleótidos diferentes a los utilizados en este kit.

Una vez creada la *Sample Sheet* y desnaturalizadas las librerías, seguir 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 **Hereditary OncoKitDx**, a través de la plataforma Data Genomics. El acceso a esta herramienta se realiza a través de: <u>www.imegen.es/datagenomics</u>.

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.

#### 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. En dicha pantalla se deben importar los ficheros fastq asociados a las muestras que han sido capturadas juntas, es decir, de una misma tanda.
- Una vez cargados los ficheros, se deberá indicar el nombre del run de secuenciación y seleccionar la modalidad de estudio, Hereditary OncoKitDx, el STID (Sample Tracking ID) usado en cada muestra (o "no stid" en caso de no haber usado ninguno) y seleccionar las muestras que se quieran analizar.
- Para llevar a cabo la solicitud, seleccionar "Process". Cuando haya finalizado el proceso con éxito aparecerá un mensaje: ✓ La importación se ha realizado correctamente.

= Solondes ×	E - 0	×
← → C	er ☆	:
S Human Variation Se: 🗰 Integrated DNA Tech 🔄 Integrated DNA Tech 🔄 RecentAmager 🍇 Traductor de Google 🗰 Eventos aprobados- 🐧 Bioarlety Sammer - C 🕇 alfocallety Sammer - C 🕇 alfocallety Sammer - C 🕇 alfocallety Sammer - C 🕇		39
ı  lı ıl imegen	🛔 jennifer.valero	ŕ
Import samples		
Date files         Securit           Add Securite Securit         Add Securite Securit		
(1 toot)		
Reference 🕆 Commant STID Modality 🗄 🛩 Piles		
		×
Princers     Child to orders		

Figura 4. Pantalla para importar los ficheros fastq y la sample sheet e iniciar la solicitud de análisis.

#### 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" se debe seleccionar "Show results" para acceder a la pantalla "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.

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 OncoKitDx** son:

- FASTQ: Los criterios establecidos de aceptación se encuentran detallados en las instrucciones de uso de Data Genomics, disponibles en: <u>www.imegen.es/datagenomics</u>.
- BAMs:
  - On-target (%):
    - Fail: < 40
    - Warn: 40 50
    - Pass: > 50
  - Duplicados (%)
    - Pass: < 25</p>
    - Warn: 25 35
    - Fail: > 35
  - DP50 (%)
    - Fail: < 80
    - Warn: 80- 92
    - Pass: > 92
- 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 5.

En caso de no superar alguno de los parámetros mencionados, aparecerá en la pantalla principal, junto a la muestra en cuestión, el icono ①.

En el ensayo **Hereditary 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.



Figura 5. Control de calidad del sistema integrado de trazabilidad.

En la petición "*CNV*" se debe seleccionar "*Show results*" para acceder a la pantalla "*Workspace*". Esta pantalla pone a disposición del usuario un fichero con los resultados brutos del análisis de CNVs y un fichero comprimido con las imágenes resultantes del análisis de CNVs (Ejemplo: Figura 6).

En la petición "*Filtering*" hay diferentes pestañas para el análisis y filtrado de las variantes puntuales y pequeñas inserciones y deleciones (pestaña "variants"), para el análisis y filtrado de las variantes de número de copias o CNVs (pestaña "CNVs"), para el análisis y filtrado de inserciones ALU y otras grandes inserciones (pestaña "Alu"), para la consulta de información relacionada con la cobertura (pestaña "*Coverage*") y para la consulta de información sobre los gaps (pestaña "*Gap*"). Desde estas pestañas se pueden aplicar distintos filtros y seleccionar las variantes que serán incluidas en el informe de resultados.

#### 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. Por tanto, dado que el número de lecturas debe ser normalizado entre diferentes muestras, la variabilidad entre muestras empeorará la identificación de las CNVs.

## illilii imegen



Figura 6. Representación del perfil de cobertura de la muestra (línea morada) respecto a la referencia (área gris) o las muestras de la misma tanda.

El cálculo de CNVs exige 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:

- 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 ADNs analizados hayan sido extraídos siguiendo los mismos protocolos de extracción.

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 un 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.

Desde el workspace se podrá un fichero con el listado de CNVs detectadas durante el análisis y desde la herramienta de filtrado y concretamente en la pestaña CNVs se podrá acceder a la representación gráfica dinámica (Figura 6) 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.

#### 8.4 Análisis de ALU o grandes inserciones

Imegen ofrece un informe del análisis de grandes inserciones, que se puede descargar 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 7. Resultados del análisis de grandes inserciones

Nota: Estas regiones, interfieren en la eficiencia del proceso de captura, por tanto, presentan una frecuencia alélica baja (>9%).

#### 8.5 Filtrado de variantes

En la petición *"Filtering"*, se listarán los distintos análisis de variantes generados hasta el momento. Desde esta petición también se podrán crear nuevos análisis con distintos filtros para crear subpaneles.

Al acceder a un análisis de variantes, aparecen todas las variantes encontradas en los 50 genes analizados en este kit o en caso de haber aplicado un filtro específico para un tipo de cáncer, con todas las variantes encontradas en los genes relacionados con el tipo de cáncer seleccionado.

linia	imege	n																			
Var	iants	1	9938														Ge	nerate CSV	Repo	rt 🕸 Fi	Iters
	Gene ^	Chr	Ref	Alt	Pos	CleanTotal	Zygosity	VariantFrec	Prot. Effect	cHgvs	pHgvs	dbSnpld	Disease CV	Clinical Sign	Own Frac Free	Own Freq	Max All Frq	Category	Imegen Cate	Actions	0
																			0.		
	BARD1	2	0		215674224	328	HOWL_ALT	0.99090	missense_variant	e.70C+T	p.P245	rs1048108	Heoplasm_of_V	BEHIGH/LIKELY_BEHIG		0.00000	0.43768	•			
	EMPRIA	10	c		88639779	109	HETZ	0.39450	missense_variant	6.404	p.P27		Hereditary_can	BENIGN		0.00000	0.45000	•	-	ICV II	
	BARRIA .	10		2	884431172	109	METT	0.51050	intere variant	C IND. IITUZ	p.r.1		Hereditary_can	BD1/01		0.00000	0.49000		0.0		
	EMPRIA	10	т	6	88483122	229	HETZ	0.51050	intena variant	6.1343.1171C		127074044	Hereditary can	ED IISH		0.00000	0.51000			IGV []	
	BRCA1	17	A	6	41245233	2.32	HETZ	0.45690	non_coding_transcript_exon_va	n.2451T+C		rs80357467	_familial_1.not	80-IIGN	0	0.00000	0.00020		-	ICV II	
	BRCA1	17		6	41245233	232	HETZ	0.45690	missense_variant	c.2315T>C	p.V772A	rs80357467	_familial_1.not	BID-HSH	0	0.00000	0.00020	•	-	IGV I	
	BRCAT	17		6	41249233	232	HETZ	0.45690	missense_variant	6.2315THC	p.V772A	1000337467	_familial_1.not,	BEHON	0	0.00000	0.00020	0	<b>10</b> -1	ICV I	
	BRCA1	17		G	41245233	232	HETZ	0.45690	intron_variant	c.787+15287>C		rs80357467	_familial_1.not,	BEHIGH	0	0.00000	0.00020	+	-	IGV (	
	BRCA1	17		6	41249233	232	HETZ	0.45690	missense_variant	e.2174T>C	p.\/7256	rs80397467	_familial_1,not,	BEHIGH	0	0.00000	0.00020	•	-	IGV (	
	BRCA1	17	A	ő	41245233	232	HETZ	0.45690	intron_variant	c.787+1528T>C		rs80357467	_familial_1,not,	BENIGN	0	0.00000	0.00020	+	-	IGV (	
	BRCA1	17	TGATTCAG	т	41246333	219	OTHER	0.31960	framashift_variant	c.1175_1214del	p.L392Qfs*5	rs80359874	_familial_1,not,	PATHOGENIC	0	0.00000	0.00001	+	-	IGV i	
	BRCA1	17	TGATTCAG	т	41246333	219	OTHER	0.31960	non_coding_transcript_exon_va	n.1311_1350del		rs80359674	_familial_1.not,	PATHOGENIC	0	0.00000	0.00001	+	-	IGV I	
	BRCA1	17	TGATTCAG	т	41246333	219	OTHER	0.31960	intron_variant	c.787+388_787+40		rs80359874	_familial_1.not,	PATHOGENIC	0	0.00000	0.00001	+	-	IGV (	
	BRCA1	17	TGATTCAG	т	41246333	219	OTHER	0.31960	frameshift_variant	c.1034_1073del	p.L345Qfs+5	rs80359874	_familial_1,not,	PATHOGENIC	0	0.00000	0.00001	+	-	IGV (	
	BRCAT	17	TGATTCAG	T	41246333	219	OTHER	0.31960	frameshift_variant	c.1175_1214del	p.13920/s15	000331674	_familial_1.not,	PATHOGENIC	0	0.00000	0.00001	0	-	ICV I	
	BRCA1	17	TGATTCAG	т	41246333	219	OTHER	0.31960	intron_variant	c.787+388_787+40		rs80359674	_familial_1.not,	PATHOGENIC	0	0.00000	0.00001	+	-	IGV I	
	BRCA2	13	6	*	32890572	119	HETZ	0.48740	5_prime_UTR_variant	c26G>A		rs1799943	_familial_2,not,	BIDHIGH	0	0.00000	0.24651	٠	C) - 1	IGV (	
	BRCA2	13	т	TTTATTTA	32903228	76	HOMZ_REF	0.11840	intron_variant	c.475+14_475+15i					0	0.00000	0.00000	+	-	IGN (	
	BRCA2	13		c	32906729	151	HETZ	0.47680	missense_variant	c.1114A-C	р.N372н	rs144848	_familial_2,not,	BEHISH	0	0.00000	0.27793	٠	-	IGV (	
	BRCA2	13	A	G	32911688	148	HETZ	0.43920	synonymous_variant	c.3396A+G	p.K1132K	rs1801406	_familial_2,not,	BEHIGH	0	0.00000	0.29449	+	0.1	IGV (	
Total:	796   Selecte	ed: 0																			

Figura 7. 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:
  - Own Frq: Frecuencia alélica de la variante en las muestras del cliente en las que se ha buscado.
  - Own Frac Freq: Fracción entre el número de veces que aparece la variante y el número de muestras totales del cliente en las que se ha analizado esta región.

Toda la información aportada por el filtrado de variantes se encuentra detallada en las instrucciones de uso de Data Genomics, disponibles en: <u>www.imegen.es/datagenomics</u>.

Cada variante hallada llevará asociada una etiqueta de calidad en la columna "Fault summary". Las posibles etiquetas son:

- q22.5: Calidad media por base inferior a 22.5.
- Q10: Calidad media de mapeo inferior a 10.

### illiilii imegen

- p8: Posición media en las lecturas inferior a 8.
- SN1.5: Distancia de la señal hasta la señal basal inferior a 1.5.
- Bias: Discordancia en el genotipo inferido entre la hebra negativa y la positiva.
- pSTD: La posición en las lecturas tiene una desviación estándar igual a 0.
- d20: Profundidad de lecturas cubriendo la posición menor de 20.
- v2: Profundidad de lecturas con la variante inferior a 2
- f0.1: Frecuencia alélica menor a 0.1.
- MSI12: Variante en región repetitiva con más de 12 repeticiones no-monoméricas o 13 repeticiones monoméricas.
- NM5.25: La media de variantes dentro de las lecturas en los que se presenta la variante es mayor a 5.25.
- InGap: La variante se encuentra en una zona de gap.
- InIns: La variante es adyacente a una inserción
- ClusterObp: La variante no es compatible con otro tipo de variantes adyacentes
- LongMSI: La variante somática está flanqueada por un polímero A/T con una longitud ≥14 bases
- AMPBIAS: La variante, en caso de estar en una región con lecturas forward y reverse, se encuentra descompensada hacia alguno de este tipo de lecturas.
- Pseudogenic\_homology: La variante aparece en una región pseudogénica.

En caso de no poseer ninguna de las etiquetas anteriores, la variante poseerá la etiqueta "PASS".

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.

La tecnología NGS todavía no es considerada la técnica "gold standard" para algunos tipos de mutaciones, por lo que se recomienda, siempre que sea posible, confirmar los resultados positivos mediante una tecnología complementaria y estandarizada.

### 9. Troubleshooting

A continuación, se enumeran los posibles resultados no esperados a lo largo del protocolo de preparación de librerías y secuenciación utilizando el **Hereditary OncoKitDx**.

- Concentración excesivamente baja de las librerías: Para llevar a cabo el proceso de captura se requieren 500 ng de la librería. En caso de no tener suficiente cantidad de librería, recomendamos analizarla con Tapestation 2200, utilizando los kits comerciales High Sensitivity D1000 reagments (Ref:5067-5585) y High Sensitivity D1000 ScreenTape (Ref:5067-5584) de Agilent Technologies (Figura 1).
  - Si el tamaño medio de la librería es el esperado y está entre 260-320 pb, se recomienda repetir la preparación de la librería revisando la calidad y la concentración del ADN de partida y el programa de amplificación.
  - Si en lugar de un único pico con un tamaño medio entre 260-320 pb aparecen varios picos, revise los diferentes pasos del protocolo de fragmentación, ligación, amplificación y purificación, así como los datos de calidad del ADN.
- Concentración demasiado alta tras la hibridación y captura: La concentración esperada de las librerías tras el proceso de captura es de 2-5 ng/µL. Concentraciones mayores podrían deberse a captura de regiones off-target por encima de lo esperado. Se recomienda revisar el protocolo de hibridación y captura y repetir el proceso de captura de las regiones de interés.
- 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 bioinformáticos establecidos: En estos casos se recomienda analizar las librerías con Tapestation 2200.
  - Si el resultado se asemeja al mostrado en la Figura 1, se aconseja revisar el protocolo de desnaturalización y carga en el secuenciador.
  - Si en lugar de un único pico con un tamaño medio entre 260-320 pb aparecen varios picos, se recomienda revisar los diferentes pasos del protocolo del protocolo de fragmentación, ligación, amplificación y purificación, así como los datos de calidad del ADN.

## illiilii imegen

- 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, se recomienda revisar que los STIDs especificados en la Sample Sheet o los indicados en la plataforma de análisis DataGenomics son los correctos.
- Problemas de cobertura: Los problemas de cobertura que afectan a otras regiones no incluidas en el apartado de limitaciones del kit (apartado 10 de este manual), pueden deberse a una baja calidad del ADN o a problemas en el protocolo de preparación y/o captura de las librerías. Se recomienda comprobar la calidad del ADN de partida y si el problema de calidad afecta a todas las muestras, se recomienda revisar los distintos pasos del protocolo.

### 10. Limitaciones

#### 10.1 Analíticas

Este estudio permite detectar todas las variantes clínicamente relevantes dentro de los genes analizados (listados en el apartado 2 de este documento). Sin embargo, la tecnología empleada no permite distinguir entre regiones que presenten una alta homología en su secuencia, como pueden ser genes homólogos, pseudogenes, etc., ni detectar grandes inserciones/deleciones, pudiendo dar lugar a falsos positivos o negativos.

Cromosoma	Posición de inicio	Posición final	Gen	Exón	Sequencia de referencia	
1	161332131	161332355	SDHC	EX6	NM_003001	
3	178937332	178937442	PIK3CA	EX12	NM_006218	
3	178937731	178937865	PIK3CA	EX13	NM_006218	
5	251426	251538	SDHA	EX13	NM_004168	
5	254481	254646	SDHA	EX13	NM_004168	
7	6013003	6013198	PMS2	EX15	NM_000535	
7	6017192	6017342	PMS2	EX14	NM_000535	
7	6018220	6018352	PMS2	EX13	NM_000535	
7	6022428	6022647	PMS2	EX12	NM_000535	
7	6027163	6027276	PMS2	EX11	NM_000535	
10	88676896	88677081	BMPR1A	EX9	NM_004329	
10	88683478	88683501	BMPR1A	EX13	NM_004329	
22	29091215	29091255	CHEK2	EX12	NM_007194	

Las regiones pseudogénicas concretas son las listadas a continuación:

Tabla 8. Listado de regiones pseudogénicas

Además, debido a la gran homología entre el gen PMS2 y sus pseudogenes en los exones 11-15, en esta región no se llevará a cabo el análisis de CNVs.

#### 10.2 Equipos

Hereditary OncoKitDx ha sido validado usando las siguientes plataformas:

SimpliAmp Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific)

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 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 específicos de dichas plataformas.

#### 10.3 Reactivos

**Hereditary 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 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 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.