

INSTRUCCIONES DE USO

32 MUESTRAS

SOPHiA DDM™ Dx **Homologous Recombination** **Deficiency Solution**



Para uso para diagnóstico in vitro (DIV)
No apto para el autodiagnóstico

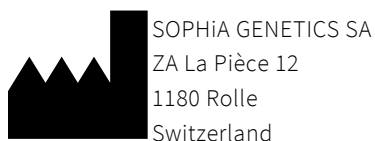




INFORMACIÓN DE RESUMEN

Nombre de producto	SOPHiA DDM™ Dx Homologous Recombination Deficiency Solution
Tipo de producto	Solución en paquete
Familia de productos	Aplicación de diagnóstico molecular (kit + análisis)
ID del algoritmo	ILL1XG1S7_FFPE_CNV_NextSeq_2
Secuenciador	Illumina® - NextSeq® 500/550
ID del panel de genes	HRD_v1
Versión del producto	v1.0
Tipo de muestra	ADN somático aislado de muestras de tejido tumoral fijado en formalina e incrustado en parafina (FFPE)
Versión de publicación	SOPHiA DDM™ Core: v6.4.0 / SOPHiA DDM™ Dx Mode: v2.4.0
ID del documento	SG-00691
Versión del documento	v5.0
Fecha de modificación	27 enero de 2026

Estas instrucciones de uso (IdU) son aplicables a todas las versiones de SOPHiA DDM™.
Lea estas IdU detenidamente antes de utilizar este producto.





CÓDIGOS DE PRODUCTO

	CÓDIGO COMPLETO DEL PRODUCTO	BOX 1	BOX 2	KIT DE PREPARACIÓN DE BANCOS
REF	BS0121ILLCSMY08-32	B1.H1.0021.C-32	B2.0021.C-32	5C0232 (x 2)



DESCARGO DE RESPONSABILIDAD

Este documento y su contenido son propiedad de SOPHiA GENETICS SA y sus filiales (en adelante, «SOPHiA GENETICS») y están destinados únicamente al uso contractual por su cliente en relación con el uso de los productos descritos en el presente documento y para ningún otro fin. Este documento y su contenido no se debe utilizar ni distribuir para ningún otro fin ni comunicar, divulgar, reproducir ni referenciar de ninguna manera sin el consentimiento previo por escrito de SOPHiA GENETICS.

SOPHiA GENETICS no otorga por medio de este documento ninguna licencia en virtud de sus derechos de patentes, marca registrada, derechos de autor o de la legislación común ni similares de terceros. Las instrucciones de este documento se deben seguir de forma rigurosa y explícita por personal cualificado y con la formación adecuada para garantizar el uso correcto y seguro de los productos aquí descritos. Se debe leer y comprender en su totalidad todo el contenido de este documento antes de utilizar dichos productos.

NO LEER COMPLETAMENTE Y SEGUIR EXPLÍCITAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES CONTENIDAS EN EL PRESENTE DOCUMENTO PUEDE PROVOCAR DAÑOS EN EL PRODUCTO O PRODUCTOS, LESIONES A LAS PERSONAS, INCLUIDOS LOS USUARIOS U OTRAS PERSONAS, Y DAÑOS MATERIALES.

SOPHiA GENETICS NO ASUMIRÁ NINGUNA RESPONSABILIDAD DERIVADA DEL USO INDEBIDO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS PARTES DE LOS MISMOS O SOFTWARE).

MARCAS REGISTRADAS

Illumina® y MiSeq® son marcas registradas de Illumina, Inc.

AMPure® y Agencourt® son marcas registradas de Beckman Coulter, Inc.

Qubit® y Dynabeads® son marcas registradas de Thermo Fisher Scientific Inc.

Agilent Fragment Analyzer™ es una marca comercial de Agilent Technologies, Inc.

SOPHiA GENETICS™ y SOPHiA DDM™ Dx son marcas comerciales de SOPHiA GENETICS SA y/o sus filiales en Estados Unidos y otros países. Todos los demás nombres, logotipos y marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios. A MENOS QUE SE IDENTIFIQUE ESPECÍFICAMENTE COMO TAL, EL USO POR PARTE DE SOPHiA GENETICS DE MARCAS DE TERCEROS NO INDICA NINGUNA RELACIÓN, PATROCINIO NI APOYO ENTRE SOPHiA GENETICS Y LOS PROPIETARIOS DE DICHAS MARCAS. Cualquier referencia por parte de SOPHiA GENETICS a marcas de terceros es para identificar los correspondientes bienes y/o servicios de los mismos y se considerará uso justo nominativo según la ley de marcas.



HISTORIAL DE MODIFICACIONES

ID DEL DOCUMENTO /VERSIÓN	FECHA	Versión de las Instrucciones de Uso equivalente en inglés	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO
SG-00691 (v5.0)	27 Enero de 2026	SG-00661 (v11.0)	• Cambio en el sistema de numeración de versiones, sin versiones adicionales entre la versión 2.3 y la version 5.0 • Se ha añadido una nueva columna en la tabla del historial de revisiones para realizar un seguimiento de la versión correspondiente en inglés; la columna está vacía para todas las revisiones anteriores. • Sección 2 – Eliminación del párrafo que describe la aplicación de escritorio SOPHiA DDM y las funcionalidades para uso exclusivo en investigación • Sección 3 – Eliminación de la descripción de los componentes de uso exclusivo en investigación, se ha refinado el ámbito para DIV del producto • Figura 1 – Cambio del nombre de la plataforma de análisis de aplicación web SOPHiA DDM a SOPHiA DDM Dx Mode, se han eliminado los componentes fuera del ámbito para DIV • Sección 5.1.1 – Adición de las limitaciones de los ciclos de congelación/descongelación para los reactivos contenidos en la Box 1 y el Library Prep Kit III • Advertencias y precauciones – Adición de los números de identificación CAS y las concentraciones de cada componente peligroso identificado • Sección 8 – Adición de la subsección Interferencias endógenas y exógenas (8.1.5) y subsección Arrastre y contaminación cruzada (8.1.6) • Sección 9.1 – Eliminación de las advertencias fuera del ámbito para DIV de las advertencias de los dispositivos • La Sección 9.2.1 se fusionó con la Sección 9.2, Limitaciones generales • Sección 9.3.1 – Eliminación de los procedimientos de apoyo de CDS, SNP/INDEL, estado propuesto de BRCA y SOPHiA DDM HRD, variación del número de copias • Eliminación del Anexo sobre CDS de SOPHiA DDM HRD • Eliminación del Anexo sobre las coordenadas genómicas de las dianas SNP de la HRD Solution • Eliminación del Anexo sobre coordenadas genómicas de las regiones diana de VNC de la HRD Solution • Cambios menores de formato y de secuencia numérica en relación con los pies de imagen, los pies de tabla, los números de sección y los números de anexo • Cambios estéticos menores • Reducción del volumen de contenido de las sondas de hibridación SOPHiA GENETICS de 20 µl a 18 µl



ID DEL DOCUMENTO /VERSIÓN	FECHA	Versión de las Instrucciones de Uso equivalente en ingles	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO
			- Secciones 5.1.1, 5.3.1 y 5.3.2 – Eliminación de la propiedad intelectual de terceros proveedores - Armonización del texto en varias secciones y anexos «Aplicación web SOPHiA DDM™» → «SOPHiA DDM™ Dx Mode» y reformulaciones menores - SOPHiA GENETICS™ → SOPHiA GENETICS - Símbolo TM insertado a lo largo del documento donde corresponde - Historial de modificaciones v4.0 – calidad de ADN actualizada a cantidad de ADN - Sección 5.2.1 – Correcciones en la sección Importante sobre cantidad de ADN - Sección 9.1 – Corrección en el punto final de la sección Advertencias
SG-00691(v2.3)	Septiembre de 2025		Actualización de la dirección de EC REP
SG-00691 (v2.2)	Marzo de 2025		Sección 5.1.1 Contenido del kit - BOX 1: Aumento del volumen del tampón de hibridación de 50 µl a 75 µl; aumento del volumen del potenciador del tampón de hibridación de 20 µl a 30 µl.
SG-00691(v2.1)	Septiembre de 2024		- Sección 5.2.1 - Se ha cambiado el umbral de longitud de fragmento DQN de «300» a «375» pb - Sección 5.2.1 - Se ha añadido el número de pieza «DNF-464-0500» para el kit HS Large Fragment 50kb en Agilent Fragment Analyzer™
SG-00691 (v2.0)	Mayo de 2022		- Cambio del nombre del Library Prep Kit - Corrección del error tipográfico en la sección 5.2.4 - Tabla de símbolos actualizada
SG-00691 (v1.0)	Mayo de 2022		Versión inicial



ÍNDICE

1. FINALIDAD PREVISTA	9
2. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS PRINCIPIOS Y EL PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO	10
3. COMPONENTES DEL PRODUCTO	11
4. SOPHiA DDM™ DX MODE	12
5. MATERIALES DEL KIT Y MÉTODOS	13
5.1. Consideraciones iniciales	13
5.1.1. Contenido del kit (32 muestras)	13
5.1.2. Material requerido (no suministrado)	17
5.2. Preparación de bancos	19
5.2.1. Preparación de ADN	19
5.2.2. Preparación de reactivos y premezclas	20
5.2.3. Fragmentación enzimática, Reparación de extremos y formación de picos con colas A	21
5.2.4. Unión	22
5.2.5. Purificación posterior a la unión	24
5.2.6. Amplificación de bancos	25
5.2.7. Purificación post-amplificación	26
5.2.8. Cuantificación de bancos individual y control de calidad	27
5.2.9. Agrupamiento de bancos para la secuenciación genómica completa (SGC) de baja cobertura	28
5.3. Captura	29
5.3.1. Agrupamiento de bancos para la hibridación y captura	29
5.3.2. Hibridación	29
5.3.3. Preparación de gránulos de estreptavidina	32
5.3.4. Unión de dianas hibridadas a gránulos	33
5.3.5. Lavar gránulos de estreptavidina para retirar el ADN no unido	33
5.3.6. Amplificación post-captura	35
5.3.7. Purificación de amplificación post-captura	36
5.3.8. Cuantificación final de bancos y control de calidad	37
5.4. Secuenciación	38
5.4.1. Preparación de bancos para secuenciación	38
6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS	40
6.1. Demultiplexación de datos de SNG	40
6.2. Carga y análisis de datos	40
6.3. Generación de informes	40
7. DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS Y PARÁMETROS	43
7.1. Archivos de recursos	43
7.2. Procesamiento previo de datos sin procesar	43
7.3. Análisis de integridad genómica	43
7.4. Cálculo del estado de SOPHiA DDM™ Dx HRD	45
8. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD	46
8.1. Evaluación de la calidad analítica	46



8.1.1. Concordancia del estado de integridad genómica con el ensayo de SNG comparativo	46
8.1.2. LD del estado de la integridad genómica del contenido tumoral	46
8.1.3. Repetibilidad del estado de la integridad genómica	46
8.1.4. Reproducibilidad del estado de la integridad genómica	47
8.1.5. Interferencias endógenas y exógenas	47
8.1.6. Arrastre y contaminación cruzada	47
8.2. Evaluación de calidad clínica	48
9. ADVERTENCIAS, LIMITACIONES Y PRECAUCIONES	49
9.1. Advertencias	49
9.2. Limitaciones	50
9.3. Precauciones	51
10. SÍMBOLOS	52
11. ASISTENCIA	53
ANEXO I. PLACAS DE CEBADORES DE INDEXADO DOBLE ÚNICOS	54
ANEXO II. FLUJO DE TRABAJO GENERAL: SOLUCIONES DE CAPTURA SOPHIA DDM™	56



1. FINALIDAD PREVISTA

La SOPHiA DDM™ Dx Homologous Recombination Deficiency (HRD) Solution es un producto sanitario para diagnóstico in vitro que puede servir de ayuda para determinar si existe deficiencia en la recombinación homóloga (HRD) en tumores de pacientes con cáncer de ovario mediante la detección semicuantitativa del biomarcador de inestabilidad genómica. El uso del producto está previsto para profesionales sanitarios y se basa en el flujo de trabajo de secuenciación de nueva generación (SNG) que utiliza el ADN genómico extraído del material tumoral con FFPE como entrada.



2. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS PRINCIPIOS Y EL PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

La SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution se compone de un kit de SNG y un pipeline bioinformático utilizados en combinación con un accesorio de DIV, la plataforma basada en la nube SOPHiA DDM™ Dx Mode. El producto está destinado al procesamiento y análisis de muestras de ADN extraídas de biopsias o muestras de ooforectomía por cáncer, todas ellas fijadas en formalina e incrustadas en parafina (FFPE).

El protocolo y kit de SNG están diseñados para que los usuarios procesen 50-100 ng de ADN para la creación de bancos de SNG, el enriquecimiento basado en hibridación por captura de 28 genes y la secuenciación con la plataforma NextSeq® 500/550 de Illumina®. Los datos de SNG resultantes presentan simultáneamente baja cobertura en todo el genoma con una cobertura esperada de ~1x (datos de secuenciación genómica completa de baja cobertura, SGC de baja cobertura) y alta cobertura en las regiones de secuenciación objetivo (cobertura esperada: ~3000x promedio).

El SOPHiA DDM™ Dx Mode protegido y basado en la nube, que alberga un pipeline bioinformático personalizado, permite a los usuarios cargar datos de SNG y obtener en PDF el informe de la SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution. En el informe se describe el estado de la SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution de ejemplo según el análisis de integridad genómica (IG).

Tenga en cuenta que los resultados de un análisis genético solo deben ser interpretados por una persona experta cualificada en genética molecular, por ejemplo, un genetista europeo de laboratorio clínico registrado (ErCLG) certificado por el European Board of Medical Genetics (EBMG).



3. COMPONENTES DEL PRODUCTO

SOPHiA DDM™ Dx HRD es una solución completa que agrupa el kit de enriquecimiento de dianas con la potencia analítica de la IA, junto con el acceso al SOPHiA DDM™ Dx Mode protegido y basado en la nube. El producto consta de dos componentes: el kit de preparación y captura de bancos (SOPHiA GENETICS™ Dx DNA Library Prep Kit III – 32 reacciones) y el pipeline bioinformático analítico utilizado en combinación con el SOPHiA DDM™ Dx Mode.

- El kit se compone de reactivos y protocolos que admiten la preparación y enriquecimiento de bancos dirigidos y compatibles con Illumina® a partir de bancos de ADN de muestras de FFPE de cáncer de ovario aptas para el enriquecimiento y secuenciación en un secuenciador NextSeq® 500/550 de Illumina®. Con el kit de enriquecimiento de dianas, los usuarios pueden generar tanto datos de SGC de baja cobertura (cobertura ~1x) como datos de secuenciación profunda dirigida (cobertura ~3000x) dentro de una única secuenciación.
- La finalidad principal del pipeline bioinformático es procesar datos de SGC de baja cobertura mediante un algoritmo de aprendizaje profundo capaz de evaluar la integridad genómica, a fin de definir el estado de SOPHiA DDM™ Dx HRD.
- El SOPHiA DDM™ Dx Mode aloja el pipeline bioinformático y la aplicación web actúa como interfaz gráfica de usuario para cargar datos de secuenciación de nueva generación (SNG) y para generar y descargar el informe de SOPHiA DDM™ Dx HRD. Consulte el SOPHiA DDM™ Dx Mode para obtener instrucciones sobre el funcionamiento de la aplicación web.

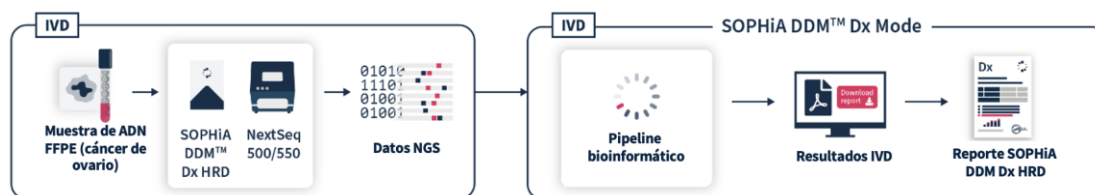


Figura 1. Descripción general de los diferentes componentes de la SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution



4. SOPHiA DDM™ DX MODE

El SOPHiA DDM™ Dx Mode es una aplicación web que proporciona una solución a los facultativos e investigadores a la hora de tomar decisiones informadas y diagnosticar enfermedades hereditarias y oncológicas, entre ellas las afecciones difíciles de diagnosticar, como son las enfermedades raras. Se realiza mediante el análisis de datos de secuenciación de nueva generación producidos en bancos de genoma completo, bancos de kits de captura de ADN o ARN y kits de amplicones para aplicaciones somáticas y de estirpe germinal. SOPHiA DDM™ está destinado a utilizarse por profesionales de laboratorio, genetistas clínicos y patólogos moleculares con formación.

Para acceder a la plataforma por primera vez, deberá registrarse. Se le pedirá que:

- Seleccione la opción «*Sign-up now*».
- Introduzca su dirección de correo electrónico. Debe utilizar la misma dirección de correo electrónico que utilizó para crear su cuenta tras la configuración. En caso de duda, contacte con el administrador de su cuenta.
- Seleccione «*Send verification code*».
- El código de verificación se enviará a su correo electrónico. Introduzca el código que reciba por correo electrónico y complete el proceso introduciendo su nombre y creando una contraseña nueva.

Las instrucciones detalladas para acceder a la plataforma y solicitar un análisis genómico se encuentran en el Manual del usuario del SOPHiA DDM™ Dx Mode.



5. MATERIALES DEL KIT Y MÉTODOS

5.1. Consideraciones iniciales

Asegúrese de que todos los tubos presentan un estado físico intacto y están almacenados a las temperaturas recomendadas, en su recepción, para una calidad óptima del kit. Una manipulación y almacenamiento inadecuados de los componentes del kit en otras condiciones puede afectar negativamente a la calidad del kit.

5.1.1. Contenido del kit (32 muestras)

Voltée siempre de forma breve los tubos antes de su uso para recoger todo el líquido.

BOX 1 (ALMACENAR ENTRE -25 °C y -15 °C)[†]

- Universal Blockers - TS Mix (12 µl)
- Human Cot DNA (25 µl)
- HRD_v1 probes by SOPHiA GENETICS (18 µl)
- 2x Hybridization Buffer (75 µl)
- Hybridization Buffer Enhancer (30 µl)
- 2x Bead Wash Buffer (1250 µl)
- 10x Stringent Wash Buffer (200 µl)
- 10x Wash Buffer I (160 µl)
- 10x Wash Buffer II (110 µl)
- 10x Wash Buffer III (110 µl)
- 32 Illumina®-compatible Unique Dual Index Primers V2 in a 96-well plate format (7 µl each): see Appendix II for primers display and sequences.
- Post Capture Illumina® Primers Mix (20 µl)
- PCR Enhancer (20 µl)
- Post Capture PCR Master Mix (122 µl)
- Stubby Universal Adapter (220 µl)

[†] La estabilidad de los reactivos congelados de la Box 1 está garantizada durante un máximo de 4 ciclos de congelación/descongelación antes de su uso.



BOX 2 (ALMACENAR ENTRE +2 Y +8 °C)

- Dynabeads® M-270 Streptavidin (440 µl)
- Agencourt® AMPure® XP (8.7 ml)
- IDTE Low TE Buffer (10 ml)
- Nuclease-free water (20 ml)

SOPHiA GENETICS™ Dx DNA Library Prep Kit III* (ALMACENAR ENTRE -25 °C Y -15 °C)†

- PCR Master Mix 2x (520 µl x 2)
- Fragmentation Buffer (77 µl x 2)
- Fragmentation Enzyme Mix (116 µl x 2)
- Ligation Mix (836 µl x 2)
- Ligation Enhancer (87 µl x 2)

* Para 32 muestras, se proporcionan dos kits de 16 muestras.

* SOPHiA GENETICS es el único distribuidor de este kit de preparación de bancos.

† La estabilidad de los reactivos congelados en el SOPHiA GENETICS™ Dx DNA Library Prep Kit III está garantizada durante un máximo de 2 ciclos de congelación/descongelación antes de su uso.



IMPORTANTE Consulte las advertencias y precauciones a continuación para ver más detalles.



ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Nombre del producto	Pictograma CLP	Declaraciones de peligro	Palabra de advertencia	Componente peligroso
2X Tampón de hibridación		• H300 Mortal en caso de ingestión. • H311 Tóxico en contacto con la piel. • H315 Provoca irritación cutánea. • H370 Provoca daños en los órganos. • H370 Provoca daños en los órganos (sistema nervioso central). • H411 Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. • P260 No respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. • P264 Lavarse...concienzudamente tras la manipulación • P270 No comer, beber ni fumar durante su utilización. • P273 Evitar su liberación al medio ambiente. • P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. • P301+P310 En caso de ingestión: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. • P302+P352 En caso de contacto con la piel: Lavar con abundante agua. • P308+P311 En caso de exposición manifiesta o presunta: Llamar a un centro de toxicología/médico. • P321 Se necesita un tratamiento específico (ver... en esta etiqueta). • P330 Enjuagarse la boca. • P332+P313 En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico. • P362+P364 Quitar la ropa contaminada y lavarla antes de volverla a usar. • P391 Recoger los vertidos. • P405 Guardar bajo llave. • P501 Eliminar el contenido/recipiente de conformidad con la normativa nacional.	Peligro	Cloruro de tetrametilamonio Concentración: 49 % CAS: 75-57-0
Potenciador de tampones de hibridación		• H351 Se sospecha que provoca cáncer. • H360 Puede perjudicar la fertilidad o dañar al feto. • H373 Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas. • P201 Solicitar instrucciones especiales antes del uso. • P202 No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad.	Peligro	Formamida Concentración: 100% CAS: 75-12-7



Nombre del producto	Pictograma CLP	Declaraciones de peligro	Palabra de advertencia	Componente peligroso
		• P260 No respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. • P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. • P308+P313 En caso de exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico. • P314 Consultar a un médico en caso de malestar. • P405 Guardar bajo llave. • P501 Eliminar el contenido/recipiente de conformidad con la normativa nacional.		
10x tampón de lavado de restricción		• H302 Nocivo en caso de ingestión. • H315 Provoca irritación cutánea. • H319 Provoca irritación ocular grave.	Peligro	Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético Concentración: 2,5 % CAS: 6381-92-6
10x tampón de lavado I		• H228 Sólido inflamable. • H302 Nocivo en caso de ingestión. • H315 Provoca irritación cutánea. • H318 Provoca lesiones oculares graves. • H332 Nocivo en caso de inhalación. • H401 Tóxico para los organismos acuáticos. • H402 Nocivo para los organismos acuáticos. • H412 Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. • P273 Evitar su liberación al medio ambiente. • P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. • P305+P351+P338 En caso de contacto con los ojos: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado. • P310 Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. • P501 Eliminar el contenido/recipiente de conformidad con la normativa nacional.	Peligro	Dodecilsulfato sódico Concentración: 4,9 % CAS: 151-21-3
Fragmentation Buffer	 	• H302: Nocivo en caso de ingestión. • H370: Provoca daños en los órganos. • H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. • P273: Evitar su liberación al medio ambiente.	Peligro	Cloruro de tetrametilamonio Concentración: 1 %-3 % CAS: 75-57-0



Nombre del producto	Pictograma CLP	Declaraciones de peligro	Palabra de advertencia	Componente peligroso
		• P260: No respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. • P270: No comer, beber ni fumar durante su utilización. • P264: Lavarse...concienzudamente tras la manipulación • P308 + P311 EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. • P301 + P312, P330 EN CASO DE INGESTIÓN: llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico si la persona se encuentra mal. Enjuagarse la boca. • P405: Guardar bajo llave. • P501: Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con toda la normativa local, regional, nacional e internacional.		

Utilice  y  como equipos de protección individual.

5.1.2. Material requerido (no suministrado)

MATERIALES SUMINISTRADOS POR EL USUARIO (SE DEBEN ADQUIRIR POR SEPARADO)

- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa
- Tubos de baja unión de ADN de 1,5 ml
- Tubos de 1,5 ml
- Tubos cónicos de 50 ml
- Puntas con filtro
- Etanol (grado de biología molecular)
- Reactivos de secuenciación Illumina®



EQUIPO DE LABORATORIO

Para cualificar las muestras: Agilent Fragment Analyzer™ System

Para evitar la contaminación de las muestras:

- Área pre-PCR
 - Equipo y reactivos para determinación cuantitativa fluorométrica
 - Soporte de separador magnético (de 96 pocillos)
 - Pipetas multicanal (P10 o P20; P100; P200)
 - Microcentrifugadora de mesa (compatible con tiras de 8 tubos)
 - Termociclador (tapa calefactora programable)
 - Agitadora vorticial
- Área post-PCR
 - Sistema de electroforesis capilar
 - Concentrador de vacío de AND
 - Equipo y reactivos para determinación cuantitativa fluorométrica
 - Soporte de separador magnético (compatible con tubos de 1,5 ml)
 - Soporte de separador magnético (de 96 pocillos)
 - Pipetas multicanal (P10 o P20; P100; P200)
 - Microcentrifugadora de mesa (compatible con tiras de 8 tubos)
 - Termociclador (tapa calefactora programable)
 - Termobloque o baño de agua (compatible con tubos de 1,5 ml)
 - Agitadora vorticial



5.2. Preparación de bancos

5.2.1. Preparación de ADN

MATERIALES

- ADN extraído de tejido fijado en formalina e incrustado en parafina (ADN de FFPE)
- IDTE
- Agua libre de nucleasas
- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa

IMPORTANTE



La SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution está destinada a muestras con contenido tumoral de al menos un 30 por ciento. La solución no admite el procesamiento de ADN de muestras con contenido tumoral de menos del 30 por ciento.

La calidad de ADN extraído de tejido FFPE es variable y puede afectar a los datos de secuenciación. La exposición a formol daña la integridad de la molécula provocando la fragmentación del ADN. También induce a artefactos de secuenciación debido a eventos de desaminación.

La integridad del ADN de muestras de ADN de FFPE se debe evaluar antes de experimentar con electroforesis en gel de alta resolución en el analizador de fragmentos (Agilent).

Evaluación de la calidad del ADN: analice 5-10 ng de ADN genómico en el Agilent Fragment Analyzer™ System con el kit HS Large Fragment 50kb (DNF-464-0500). La calidad del ADN genómico se evalúa según el número de calidad de ADN (DQN, por sus siglas en inglés). Defina el umbral del DQN en 375 bp y extraiga el DQN para sus muestras de ADN.



Importante: Procesar una muestra sin medir el DQN o con un DQN inferior a 3 podría derivar en un rendimiento deficiente en la preparación de bancos de genoma completo, así como una calidad de datos de SNG insuficiente, lo que puede generar resultados no concluyentes (consulte la sección Advertencias y limitaciones).

En función de la calidad del ADN, ajuste el protocolo según la *Tabla 1* de la página 19.

Tabla 1. Cantidad recomendada de ADN a utilizar como entrada según la calidad del ADN

RECOMENDACIONES DE INTRODUCCIÓN SEGÚN LA CALIDAD DEL ADN			
Calidad del ADN	DQN < 3	3 ≤ DQN ≤ 5	5 < DQN ≤ 10
	Menos del 30 % de fragmentos de ADN con más de 375 bp	30 % - 50 % de fragmentos de ADN con más de 375 bp	Más del 50 % de fragmentos de ADN con más de 375 bp
Cantidad de ADN (ng)	No procesar la muestra	100 ng*	50 ng

*Si no es posible utilizar 100 ng de material de entrada debido a una cantidad insuficiente de material inicial, se recomienda utilizar 50 ng de material de entrada y aumentar el número de ciclos de PCR a 10 en el paso 5.2.6 para obtener un rendimiento adecuado del banco.

Para evitar errores en el aporte de ADN, se recomienda utilizar una dilución inicial para obtener una concentración de rango 10 a 20 ng/μl. La concentración de ADN se debe confirmar mediante determinación cuantitativa fluorométrica (p. ej., Qubit®, Thermo Fisher) y el valor obtenido se utiliza para calcular la dilución final.



PROCEDIMIENTO

1. Prepare las siguientes tiras de PCR de acuerdo al número de reacciones:

NÚMERO DE REACCIONES	8	16	24	32
Tira de PCR	De 4 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos
Número de tiras	2	2	3	4

2. Prepare una dilución de cada muestra de ADN extraído en el número adecuado de tiras de PCR, de la siguiente manera:

DILUCIÓN DE ADN	
ADN	Cantidad de ADN (véase la <i>Tabla 1</i> de la página 19)
IDTE	Completo hasta 40 µl

3. Mezcle brevemente pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces, seguido de un breve ciclo en una microcentrifugadora para acumular todo el líquido.



Consejo: Punto de parada seguro durante la noche a 4 °C.

5.2.2. Preparación de reactivos y premezclas

COMPONENTES Y REACTIVOS

- Fragmentation Enzyme Mix
- Fragmentation Buffer
- Potenciador de unión
- Mezcla de unión
- PCR Master Mix 2x
- Agua libre de nucleasas
- Gránulos AMPure® XP
- Etanol

PREPARACIÓN

- Extraiga los componentes del SOPHiA GENETICS™ Dx DNA Library Prep Kit III del almacenamiento a -20 °C y descongélelos en hielo.
- Retire los gránulos AMPure® XP del almacenamiento a 2-8 °C y deje que se equilibren a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos. Mezcle bien con una agitadora vorticial los gránulos AMPure® XP a fin de garantizar la resuspensión adecuada de los gránulos antes de su uso en todos los pasos posteriores.
- Prepare etanol puro al 80 % (volumen según el siguiente esquema en función del número de reacciones).

ETANOL 80 %				
Número de reacciones	8	16	24	32
Etanol 80 % (en ml)	10	20	30	40



- Asegúrese de que el Fragmentation Buffer del SOPHiA GENETICS™ Dx DNA Library Prep Kit III se haya descongelado por completo.
- Mezcle bien y haga girar todos los reactivos antes de su uso y colóquelos en hielo.

PREMEZCLAS

1. Prepare la **premezcla de fragmentación** de la siguiente manera:

PREMEZCLA DE FRAGMENTACIÓN				
Número de reacciones	8	16	24	32
Fragmentation Buffer (en µl)	38,4	76,8	115,2	153,6
Enzima de fragmentación (en µl)	57,6	115,2	172,8	230,4

- Conserve en hielo.

2. Prepare la **premezcla de unión** de la siguiente forma:

PREMEZCLA DE UNIÓN				
Número de reacciones	8	16	24	32
Mezcla de unión (en µl)	418	836	1254	1672
Potenciador de unión (en µl)	14,4	28,8	43,2	57,6

- Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces y hágala girar brevemente.
- Conserve en hielo.



Importante: La Ligation Mix es muy viscosa, pipetee suavemente y asegúrese de obtener una premezcla de unión homogénea.

5.2.3. Fragmentación enzimática, Reparación de extremos y formación de picos con colas A

MATERIALES

- ADN bicatenario diluido en 40 µl
- Premezcla de fragmentación
- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa



PREPARACIÓN

- Programe el termociclador para la fragmentación con los siguientes ajustes:

TEMPERATURA (°C)		TIEMPO (MINUTOS)
Tapa	99	
Paso 1	4	1
Paso 2	37	20
Paso 3	65	30
Espera	4	∞

Inicie el programa de fragmentación. Cuando el bloque alcance el paso 1 (4 °C), pause el programa.

PROCEDIMIENTO



Importante: Conserve siempre en hielo las muestras y la premezcla antes y después de la incubación para bloquear la reacción enzimática.

1. Para facilitar el pipeteo, cree un reservorio de una premezcla de fragmentación añadiendo los siguientes volúmenes a un nuevo grupo de tiras de 4 u 8 tubos de acuerdo al siguiente esquema:

NÚMERO DE REACCIONES	8	16	24	32
Tira PCR (1 tira)	De 4 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos
Premezcla de fragmentación (en µl)	23	23	35	46

2. Componga la reacción de la siguiente forma:
 - Con una pipeta multicanal, añada 10 µl de la premezcla de fragmentación a cada 40 µl de muestras de ADN (en total, 50 µl en tiras de 4 u 8 tubos).
 - Con una pipeta multicanal ajustada a 35 µl, mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 5 veces y hágalas girar brevemente en una microcentrifugadora.
3. Colóquelas en un termociclador y continúe con el programa de fragmentación.

Continúe de inmediato con la unión.

5.2.4. Unión

MATERIALES

- Productos de reacción de fragmentación en 50 µl cada uno
- Premezcla de unión
- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa



PREPARACIÓN

- Durante la fragmentación, prepare nuevas tiras de PCR con 5 µl de adaptador corto universal según este esquema:

NÚMERO DE REACCIONES	8	16	24	32
Tira PCR (1 tira)	De 4 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos
Número de tiras	2	2	3	4

- Ajuste el termociclador a 20 °C (con la tapa abierta).

PROCEDIMIENTO



Importante: Conserve siempre en hielo las muestras y la premezcla antes y después de la incubación para bloquear la reacción enzimática.

- Para facilitar el pipeteo, cree un reservorio de una premezcla de unión en un nuevo grupo de tiras de PCR de acuerdo al siguiente esquema:

NÚMERO DE REACCIONES	8	16	24	32
Tira PCR (1 tira)	De 4 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos
Premezcla de unión (en µl)	100	100	150	200

- Con una pipeta multicanal, transfiera los 50 µl de cada producto de reacción de fragmentación a las tiras de 4 u 8 tubos con 5 µl de adaptador corto universal.
- Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces y hágala girar brevemente.
- Con una pipeta multicanal, añada 45 µl de la premezcla de unión a cada producto de reacción de fragmentación (55 µl en cada tubo de la tira de 4 u 8 tubos).
- Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces y hágala girar brevemente.
- Deje incubar en el termociclador a 20 °C durante 15 minutos (con la tapa abierta).

Continúe con la purificación posterior a la unión.



Importante: No coloque las tiras en hielo al final de la unión, ya que puede disminuir la unión del ADN a los gránulos.



5.2.5. Purificación posterior a la unión

MATERIALES

- Productos de reacción de unión en 100 µl cada uno
- Gránulos AMPure® XP equilibrados a temperatura ambiente
- Etanol 80 % recién preparado
- IDTE
- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa

PROCEDIMIENTO

1. Con una pipeta multicanal, añada 80 µl de gránulos AMPure® XP a cada 100 µl de productos de reacción de unión. Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces.
2. Deje incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y haga girar brevemente, si es necesario.
3. Coloque la tira de 4 u 8 tubos en un soporte magnético con formato de placa de 96 pocillos durante 5 minutos o hasta que el líquido sea transparente.

4. Deseche con cuidado 170 µl de sobrenadante con una pipeta multicanal.

Mantenga los tubos en el soporte magnético durante los siguientes pasos.

5. Con una pipeta multicanal, añada a los gránulos 170 µl de etanol al 80 %. Deje incubar entre 30 segundos y 1 minuto.
6. Deseche con cuidado el etanol con una pipeta multicanal.
7. Repita una vez los pasos 5 y 6.
8. Retire el etanol remanente con una pipeta multicanal P10 o P20.
9. Deje secar al aire los gránulos a temperatura ambiente durante 5 minutos. No seque en exceso los gránulos porque podría disminuir la cantidad de ADN recuperado.

Retire los tubos del soporte magnético.

10. Con una pipeta multicanal, añada a los gránulos 20 µl de IDTE.

Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces y hágala girar brevemente.

Continúe con la amplificación de bancos.



5.2.6. Amplificación de bancos

MATERIALES

- Productos de reacción unida y gránulos resuspendidos en 20 µl de IDTE cada uno
- PCR Master Mix 2x
- 32 placas de cebadores de indexado doble únicos para Illumina®

PREPARACIÓN

- Programe el termociclador para la amplificación de bancos con los siguientes ajustes:

	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (SEGUNDOS)	
Tapa	99	-	
Paso 1: Desnaturalización inicial	98	120	
Paso 2: Desnaturalización	98	20	8 ciclos
Paso 3: Hibridación	60	30	
Paso 4: Extensión	72	30	
Paso 5: Ampliación final	72	60	
Espera	10	∞	

PROCEDIMIENTO

1. Para facilitar el pipeteo, cree un reservorio de PCR Master Mix 2x añadiendo los siguientes volúmenes a un nuevo grupo de tiras de 4 u 8 tubos de acuerdo al siguiente esquema:

NÚMERO DE REACCIONES	8	16	24	32
Tira PCR (1 tira)	De 4 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos
PCR Master Mix 2x (en µl)	60	60	85	120

2. Componga la reacción de la siguiente forma:
 - Con una pipeta multicanal, añada 5 µl de diferentes cebadores de indexado doble únicos por tubo a los productos de unión y gránulos, según su estrategia de indexado.
 - Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces y hágala girar brevemente.



- Con una pipeta multicanal, añada 25 µl de PCR Master Mix 2x a los productos de unión y gránulos (50 µl en tiras de 4 u 8 tubos). Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces y hágala girar brevemente.
3. Coloque los tubos en el termociclador y ejecute el programa Amplificación de bancos.



Consejo: Punto de parada seguro durante la noche a 4 °C.

5.2.7. Purificación post-amplificación

MATERIALES

- Productos de reacción de PCR en 50 µl cada uno
- Gránulos AMPure® XP equilibrados a temperatura ambiente
- Etanol 80 % recién preparado
- Agua libre de nucleasas
- Tubos de baja unión de ADN para el almacenamiento de bancos

PROCEDIMIENTO

1. Con una pipeta multicanal, añada 50 µl de gránulos AMPure® XP a cada 50 µl de producto PCR. Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces.
2. Deje incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y haga girar brevemente, si es necesario.
3. Coloque las tiras de 4 u 8 tubos en un soporte magnético con formato de placa de 96 pocillos durante 5 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
4. Deseche con cuidado 90 µl de sobrenadante con una pipeta multicanal.

Mantenga los tubos en el soporte magnético durante los siguientes pasos.

5. Con una pipeta multicanal, añada a los gránulos 170 µl de etanol al 80 %. Deje reposar los tubos entre 30 segundos y 1 minuto.
6. Deseche con cuidado el etanol con una pipeta multicanal.
7. Repita una vez los pasos 5 y 6.
8. Retire el etanol remanente con una pipeta multicanal P10 o P20.
9. Deje secar al aire los gránulos a temperatura ambiente durante 5 minutos. No seque en exceso los gránulos porque podría disminuir la cantidad de ADN recuperado.

Retire los tubos del soporte magnético.

10. Con una pipeta multicanal, añada a los gránulos 30 µl de agua libre de nucleasas. Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces. Deje incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y haga girar brevemente, si es necesario.



11. Coloque la tira de 4 u 8 tubos en un soporte magnético con formato de placa de 96 pocillos durante 5 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
12. Transfiera con cuidado 28 µl del sobrenadante a un nuevo tubo de almacenamiento de bancos etiquetado.



Consejo: Punto de parada seguro durante la noche a 4 °C o a -20 °C para un almacenamiento prolongado.

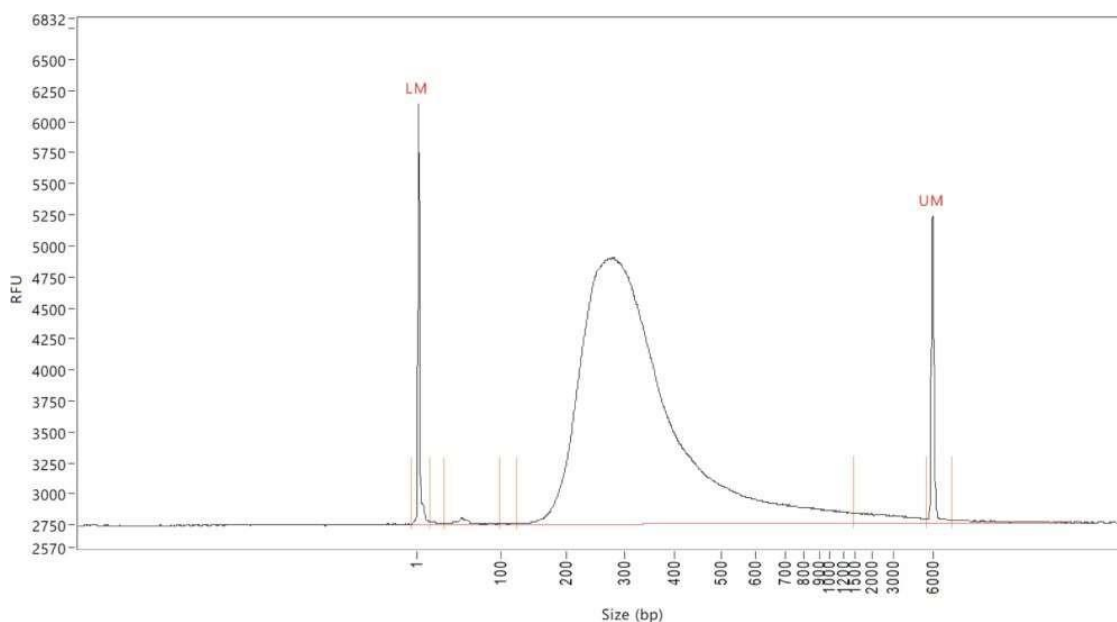
5.2.8. Cuantificación de bancos individual y control de calidad

MATERIALES

- Equipo y reactivos para determinación cuantitativa fluorométrica
- Sistema de electroforesis capilar
- Agua libre de nucleasas
- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa

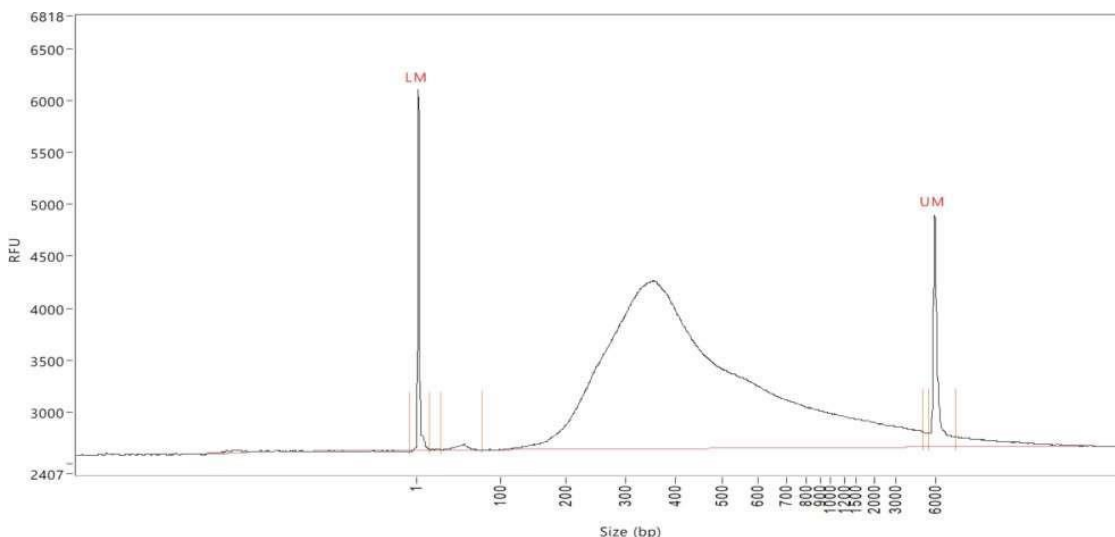
PROCEDIMIENTO

1. Prepare una dilución a 1:4 de cada banco con agua libre de nucleasas (p. ej., 2 µl de un banco en 6 µl de agua libre de nucleasas).
2. Cuantifique los bancos con un método fluorométrico (p. ej., cuantificación Qubit HS con 2 µl de la dilución de bancos a 1:4 mencionada anteriormente).
3. Controle la calidad de los bancos analizando su perfil mediante electroforesis capilar. Los fragmentos de ADN de bancos deben tener una distribución de tamaño de entre 200 bp y 800 bp.





Ejemplo de distribución de bancos de ADN obtenida con el sistema de electroforesis capilar Agilent Fragment Analyzer™. LM hace referencia a Lower Marker (Marcador inferior), UM hace referencia a Upper Marker (Marcador superior).



Ejemplo de distribución de bancos de ADN obtenida con el sistema de electroforesis capilar Agilent Fragment Analyzer™. LM hace referencia a Lower Marker (Marcador inferior), UM hace referencia a Upper Marker (Marcador superior).

5.2.9. Agrupamiento de bancos para la secuenciación genómica completa (SGC) de baja cobertura

MATERIALES

- Bancos individuales
- IDTE
- Tubos de baja unión de ADN de 1,5 ml

PROCEDIMIENTO

1. Determine la molaridad de cada banco con un tamaño medio de bancos (tamaño del pico en pares de bases) y una concentración (ng/μl) obtenida durante el paso 5.2.8 de la siguiente manera:

$$\text{Molaridad de bancos (nM)} = \frac{\text{Concentración de bancos (ng/μl)}}{\text{Tamaño medio en pares de bases} \times 649,5} \times 10^6$$

2. Transfiera 2 μl de cada banco individualmente a un tubo nuevo y diluya a 10 nM con IDTE.
3. Agrupe bancos individuales a 10 nM combinando 5 μl de cada dilución de bancos. Combine los mismos bancos en un solo grupo que se combinará en el grupo de captura. Al procesar varias capturas, cree el mismo número de grupos de SGC que hay en el grupo de captura.

Consejo: Punto de parada seguro durante la noche a 4 °C o a -20 °C para un almacenamiento prolongado.



5.3. Captura

5.3.1. Agrupamiento de bancos para la hibridación y captura

MATERIALES

- Bancos individuales
- Human Cot DNA
- Universal Blockers - TS Mix
- Tubos de baja unión de ADN de 1,5 ml

PROCEDIMIENTO

1. Prepare una premezcla de lo siguiente en un tubo de baja unión de ADN:

NÚMERO DE CAPTURAS	1	2	3	4
Human Cot DNA (en μ l)	5	11	16,5	22
Universal Blockers – TS Mix (en μ l)	2	4,4	6,6	8,8

2. Al llevar a cabo dos o más capturas, pipetee 7 μ l de la premezcla anterior en tubos de baja unión de ADN individuales.
3. Añada un grupo de 8 bancos individuales con 200 ng de cada uno (total de 1600 ng) por captura a los tubos individuales que contienen la premezcla anterior.
4. Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces y hágala girar brevemente.
5. Seque cada mezcla con un concentrador de vacío de ADN hasta que la mezcla esté completamente liofilizada. Utilice una temperatura suave (45-50 °C) para acelerar la liofilización.



Consejo: Punto de parada seguro durante la noche a -20 °C.

5.3.2. Hibridación

MATERIALES

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Bancos liofilizados • 2x tampón de hibridación • Potenciador de tampones de hibridación • HRD_v1 Probes • Agua libre de nucleasas • Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa | <ul style="list-style-type: none"> • Tubos de 1,5 ml • 10x tampón de lavado I • 10X tampón de lavado II • 10X tampón de lavado III • 10x tampón de lavado de restricción • 2x tampón de lavado con gránulos |
|--|---|



PREPARACIÓN

1. Precaliente el termociclador a 95 °C (ajuste la tapa a 99 °C).
2. Tras la desnaturalización de 10 minutos, cámbielo directamente a 65 °C (ajuste la tapa a 75 °C).



Importante: Recomendamos el uso de distintos termocicladores para las incubaciones a 95 °C y 65 °C, en caso de disponibilidad.

PROCEDIMIENTO

1. Prepare una premezcla de hibridación según el número de reacciones de captura:

NÚMERO DE CAPTURAS	1	2	3	4
2x tampón de hibridación (en µl)	8,5	18,7	28,05	37,4
Potenciador de tampones de hibridación (en µl)	3,4	7,48	11,22	14,96
Agua libre de nucleasas (en µl)	1,1	2,42	3,63	4,84

2. Vuelva a suspender el sedimento liofilizado en 13 µl de la premezcla de hibridación.
3. Transfiera el sedimento suspendido de nuevo a un tubo de PCR (un tubo por reacción de captura).
4. Deje incubar en el termociclador a 95 °C durante 10 minutos.



Importante: No deje que la temperatura del tubo baje de 65 °C entre los pasos 4 y 6, ya que puede derivar en una hibridación de sondas incorrecta.

5. Mueva el tubo de PCR del termociclador a 95 °C al termociclador a 65 °C; después, añada a la mezcla 4 µl de sondas. Con una pipeta ajustada a 13 µl, mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 5 veces.
6. Deje incubar en el termociclador a 65 °C de 4 a 16 horas.
7. Prepare las soluciones de trabajo a 1x de diferentes tampones de lavado con antelación, tal y como se describe en las siguientes páginas, para que alcancen el equilibrio durante la reacción de hibridación.



PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE LAVADO PARA 1 REACCIÓN

TAMPÓN	TAMPÓN MADRE (μl)	AGUA (μl)	VOLUMEN FINAL 1X (μl)
10x tampón de lavado I	33	297	330
10x tampón de lavado II	22	198	220
10x tampón de lavado III	22	198	220
10x tampón de lavado de restricción	44	396	440
2x tampón de lavado con gránulos	275	275	550



Importante: Precaliente 1x tampón de restricción y una alícuota de 110 μl de 1x tampón de lavado I a 65 °C en un termobloque o baño de agua durante al menos 2 horas. Mantenga el tampón de lavado I restante a temperatura ambiente.

PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE LAVADO PARA 2 REACCIONES

TAMPÓN	TAMPÓN MADRE (μl)	AGUA (μl)	VOLUMEN FINAL 1X (μl)
10x tampón de lavado I	66	594	660
10x tampón de lavado II	44	396	440
10x tampón de lavado III	44	396	440
10x tampón de lavado de restricción	88	792	880
2x tampón de lavado con gránulos	550	550	1100



Importante: Precaliente 1x tampón de restricción y una alícuota de 220 μl de 1x tampón de lavado I a 65 °C en un termobloque o baño de agua durante al menos 2 horas. Mantenga el tampón de lavado I restante a temperatura ambiente.

PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE LAVADO PARA 3 REACCIONES

TAMPÓN	TAMPÓN MADRE (μl)	AGUA (μl)	VOLUMEN FINAL 1X (μl)
10x tampón de lavado I	99	891	990
10x tampón de lavado II	66	594	660
10x tampón de lavado III	66	594	660
10x tampón de lavado de restricción	132	1188	1320
2x tampón de lavado con gránulos	825	825	1650



Importante: Precaliente 1x tampón de restricción y una alícuota de 330 μl de 1x tampón de lavado I a 65 °C en un termobloque o baño de agua durante al menos 2 horas. Mantenga el tampón de lavado I restante a temperatura ambiente.



PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE LAVADO PARA 4 REACCIONES

TAMPÓN	TAMPÓN MADRE (μl)	AGUA (μl)	VOLUMEN FINAL 1X (μl)
10x tampón de lavado I	132	1188	1320
10x tampón de lavado II	88	792	880
10x tampón de lavado III	88	792	880
10x tampón de lavado de restricción	176	1584	1760
2x tampón de lavado con gránulos	1100	1100	2200



Importante: Precaliente 1x tampón de restricción y una alícuota de 440 μl de 1x tampón de lavado I a 65 °C en un termobloque o baño de agua durante al menos 2 horas. Mantenga el tampón de lavado I restante a temperatura ambiente.

5.3.3. Preparación de gránulos de estreptavidina

MATERIALES

- Gránulos de estreptavidina equilibrados a temperatura ambiente
- 1x tampón de lavado con gránulos
- Tubos de 1,5 ml
- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa

PROCEDIMIENTO

Realice estos pasos justo antes de terminar la incubación de hibridación.

1. Mezcle los gránulos con una agitadora vorticial durante 15 segundos.
2. Transfiera 100 μl de gránulos por captura (200 μl para 2 reacciones, 300 μl para 3 reacciones, 400 μl para 4 reacciones) a un solo tubo de 1,5 ml.
3. Coloque el tubo en un soporte magnético y déjelo reposar hasta que la solución sea transparente. Retire y deseche con cuidado el sobrenadante.
4. Añada al tubo 200 μl de 1x tampón de lavado con gránulos por captura (400 μl para 2 reacciones, 600 μl para 3 reacciones, 800 μl para 4 reacciones). Mezcle con una agitadora vorticial durante 10 segundos.
5. Coloque el tubo en un soporte magnético y déjelo reposar hasta que la solución sea transparente. Retire y deseche con cuidado el sobrenadante.
6. Repita una vez los pasos 4 y 5.
7. Añada al tubo 100 μl de 1x tampón de lavado con gránulos por captura (200 μl para 2 reacciones, 300 μl para 3 reacciones, 400 μl para 4 reacciones). Mezcle con una agitadora vorticial durante 10 segundos.
8. Transfiera a un nuevo tubo de PCR 100 μl de gránulos purificados (un tubo por reacción de captura).



9. Coloque los tubos en un soporte magnético con formato de placa de 96 pocillos y déjelos reposar hasta que la solución sea transparente. Retire y deseche con cuidado el sobrenadante.



Importante: No deje que los gránulos se sequen.

Continúe de inmediato con Unión de dianas hibridadas a gránulos.

5.3.4. Unión de dianas hibridadas a gránulos

MATERIALES

- Gránulos de estreptavidina purificados en tubos para PCR
- Reacciones de hibridación

PROCEDIMIENTO



Importante: Trabaje rápido para garantizar que la temperatura se mantenga cerca de los 65 °C.

1. Elimine la reacción de hibridación del termociclador, gire brevemente los tubos y colóquelos de nuevo en el termociclador.
2. Coloque los tubos de gránulos de estreptavidina lavados en el termociclador (máximo dos tubos a la vez para evitar que los gránulos se sequen).
3. Para cada reacción de hibridación, transfiera 17 µl de la solución de la reacción de hibridación a un tubo de PCR que contenga gránulos purificados. Vuelva a suspender los gránulos pipeteando hacia arriba y hacia abajo hasta que la solución sea homogénea.
4. Una el ADN a los gránulos colocando los tubos en un termociclador ajustado a 65 °C (tapa a 75 °C). Deje incubarse durante 45 minutos.
5. Durante la incubación, pipetee hacia arriba y hacia abajo suavemente los tubos cada 15 minutos para garantizar que los gránulos sigan en suspensión.

Continúe directamente con Lavar gránulos de estreptavidina para retirar el ADN no unido.

5.3.5. Lavar gránulos de estreptavidina para retirar el ADN no unido.

MATERIALES

- | | |
|--|--|
| • Dianas hibridadas en gránulos | • 1x tampón de lavado II |
| • Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa | • 1x tampón de lavado III |
| • Tubos de baja unión de ADN de 1,5 ml | • 1x tampón de lavado de restricción (a 65 °C) |
| • 1x tampón de lavado I (1/3 a 65 °C y 2/3 a temperatura ambiente) | • Agua libre de nucleasas |
| | • IDTE |



PROCEDIMIENTO



Asegúrese que la temperatura se mantenga cerca de los 65 °C en los pasos 1 a 7.

Nota: Si trabaja con 2 o más tubos de captura, trabaje de forma escalonada de los pasos 2 a 8, incluido:

1. Al colocar el primer tubo en un termobloque a 65 °C para la primera incubación de 5 minutos (paso 5), ponga en marcha un temporizador.
2. Comience a procesar el segundo tubo.
3. Al poner el segundo tubo a 65 °C, anote el tiempo de separación de los tubos y asegúrese de respetar este espacio de tiempo a lo largo de los pasos 2 a 8 para garantizar que cada tubo se incube exactamente 5 minutos a 65 °C con el lavado de restricción.

1. Añada 100 µl de 1x tampón de lavado I (a 65 °C) a cada tubo de gránulos de estreptavidina/dianas hibridadas.
2. Trabajando con un tubo cada vez, resuspenda y transfiera la mezcla de uno en uno a un nuevo tubo de baja unión de ADN de 1,5 ml. Si va a trabajar con dos o más tubos de captura, trabaje de forma escalonada como se indica anteriormente.
3. Coloque el tubo en un soporte magnético y déjelo reposar hasta que la solución sea transparente. Retire y deseche con cuidado el sobrenadante.
4. Añada al tubo 200 µl de 1x tampón de lavado de restricción (a 65 °C). Vuelva a suspender suavemente los gránulos pipeteando hacia arriba y hacia abajo.



Mezclar en exceso los gránulos con el tampón de lavado de restricción podría reducir la calidad de la captura.

5. Deje incubar a 65 °C durante 5 minutos.
6. Coloque el tubo en un soporte magnético y déjelo reposar hasta que la solución sea transparente. Retire y deseche con cuidado el sobrenadante.
7. Repita una vez los pasos 4 a 6.

Trabaje a temperatura ambiente.

8. Añada al tubo 200 µl de 1x tampón de lavado I (a temperatura ambiente). Vuelva a suspender suavemente los gránulos pipeteando hacia arriba y hacia abajo.

Nota: Si trabaja con 2 o más tubos de captura, de este paso en adelante, procese todos los tubos al mismo tiempo.

9. Mezcle con una agitadora vortical durante 2 minutos.
10. Coloque los tubos en un soporte magnético y déjelos reposar hasta que la solución sea transparente. Retire y deseche con cuidado el sobrenadante.
11. Añada a cada tubo 200 µl de 1x tampón de lavado II. Mezcle con una agitadora vortical durante 1 minuto.



12. Coloque los tubos en un soporte magnético y déjelos reposar hasta que la solución sea transparente. Retire y deseche con cuidado el sobrenadante.
13. Añada a cada tubo 200 µl de 1x tampón de lavado III. Mezcle con una agitadora vorticial durante 30 segundos. Hágalos girar brevemente para acumular todo el líquido.
14. Coloque los tubos en un soporte magnético y déjelos reposar hasta que la solución sea transparente. Retire y deseche con cuidado el sobrenadante.
15. Añada a cada tubo 200 µl de 1x IDTE. Vuelva a suspender los gránulos. Hágalos girar brevemente para acumular todo el líquido.
16. Coloque los tubos en un soporte magnético y déjelos reposar hasta que la solución sea transparente. Retire y deseche con cuidado el sobrenadante.
17. Retire todo el líquido restante con una pipeta P10 o P20.
18. Añada a cada tubo 20 µl de agua libre de nucleasas, vuelva a suspender y transfiera la mezcla de gránulos/agua a un nuevo tubo de PCR.

5.3.6. Amplificación post-captura

MATERIALES

- Suspensión de agua libre de nucleasas/de gránulos de estreptavidina (20 µl)
- Mezcla maestra para PCR 2x post-captura
- Mezcla para cebadores Illumina® post-captura
- Potenciador de PCR
- Agua libre de nucleasas

PREPARACIÓN

- Programe el termociclador para la amplificación post-captura con los siguientes ajustes:

	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (SEGUNDOS)	
Tapa	99	-	15 ciclos
Paso 1: Desnaturalización inicial	98	120	
Paso 2: Desnaturalización	98	20	
Paso 3: Hibridación	60	30	
Paso 4: Extensión	72	30	
Paso 5: Ampliación final	72	60	
Espera	10	∞	



PROCEDIMIENTO

1. Prepare la premezcla de PCR de la siguiente forma:

PREMEZCLA DE PCR				
Número de reacciones	1	2	3	4
Mezcla maestra para PCR 2x post-captura (en µl)	25	55	82,5	110
Mezcla para cebadores Illumina® post-captura (en µl)	2,5	5,5	8,25	11
Potenciador de PCR (en µl)	2,5	5,5	8,25	11

2. Añada 30 µl de premezcla de PCR a cada suspensión de gránulos. Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces y hágala girar brevemente.
3. Coloque los tubos en el termociclador y ejecute el programa de amplificación post-captura.



Consejo: Punto de parada seguro durante la noche a 4 °C o a -20 °C para un almacenamiento prolongado.

5.3.7. Purificación de amplificación post-captura

MATERIALES

- Productos de reacción de PCR en 50 µl cada uno
- Gránulos AMPure® XP equilibrados a temperatura ambiente
- Etanol 80 % recién preparado
- IDTE
- Tubos de baja unión de ADN para almacenamiento de bancos

PROCEDIMIENTO

1. Añada 50 µl de gránulos AMPure® XP a cada uno de los productos de reacción de PCR con 50 µl. Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces.
2. Deje incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y hágalo girar brevemente si es necesario para retirar el líquido de las paredes del tubo.
3. Coloque los tubos en un soporte magnético durante 5 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
4. Deseche con cuidado 90 µl de sobrenadante con una pipeta multicanal.

Mantenga los tubos en el soporte magnético durante los siguientes pasos.

5. Con una pipeta multicanal, añada a los gránulos 170 µl de etanol al 80 %. Deje reposar los tubos entre 30 segundos y 1 minuto.
6. Deseche con cuidado el etanol.



7. Repita una vez los pasos 5 y 6.
8. Retire el etanol remanente con una pipeta P10 o P20.
9. Deje secar al aire los gránulos a temperatura ambiente durante 5 minutos. No seque en exceso los gránulos porque podría disminuir la cantidad de ADN recuperado.

Retire los tubos del soporte magnético.

10. Añada a los gránulos 20 µl de IDTE. Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces. Deje incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y hágalo girar brevemente para retirar el líquido de las paredes del tubo.
11. Coloque los tubos en un soporte magnético durante 5 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
12. Transfiera con cuidado 18 µl de sobrenadante (la recomendación en este paso es transferir 9 µl dos veces) a un nuevo tubo de almacenamiento de bancos etiquetado.



Consejo: Punto de parada seguro durante la noche a 4 °C o a -20 °C para un almacenamiento prolongado.

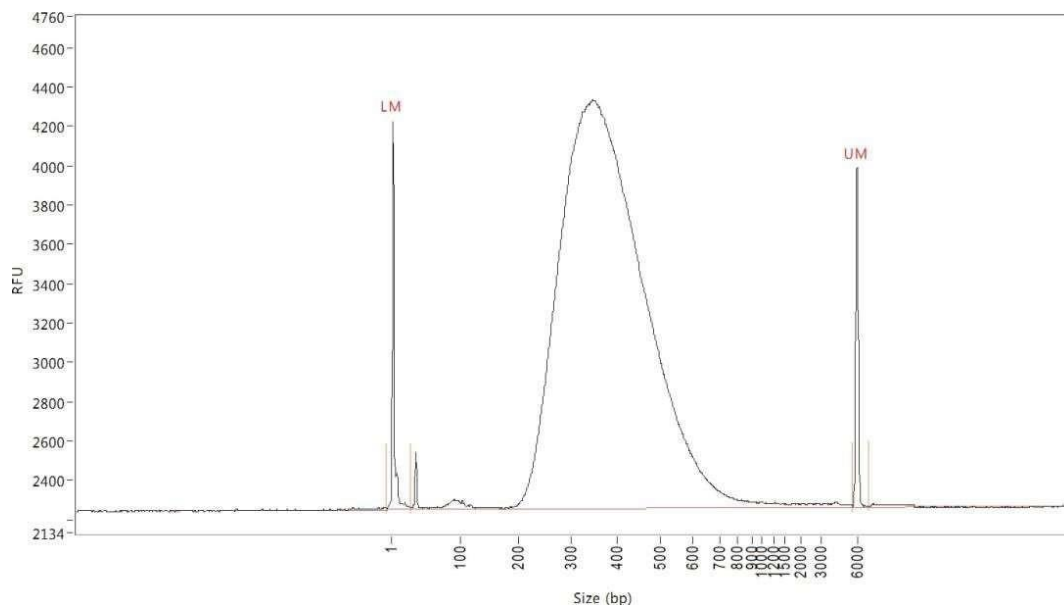
5.3.8. Cuantificación final de bancos y control de calidad

MATERIALES

- Equipo y reactivos para determinación cuantitativa fluorométrica
- Sistema de electroforesis capilar

PROCEDIMIENTO

1. Cuantifique cada grupo de bancos capturado con un método fluorométrico (p. ej., cuantificación Qubit HS con 2 µl del banco).
2. Controle la calidad del grupo de bancos capturado analizando su perfil mediante electroforesis capilar. Los fragmentos de ADN de bancos deben tener una distribución de tamaño de entre 200 bp y 800 bp.





Ejemplo de distribución del tamaño del grupo de bancos post-captura obtenida con el sistema de electroforesis capilar Agilent Fragment Analyzer™. LM hace referencia a Lower Marker (Marcador inferior), UM hace referencia a Upper Marker (Marcador superior).

5.4. Secuenciación

5.4.1. Preparación de bancos para secuenciación

MATERIALES

- Kit de secuenciación NextSeq® de Illumina®
- Bancos finales capturados
- Tampón de elución modificado o similar

PROCEDIMIENTO

1. Determine la molaridad de cada grupo capturado con un tamaño medio de bancos (tamaño del pico en pares de bases) y una concentración (ng/μl) obtenida durante el paso 5.3.8 de la siguiente manera:

$$\text{Molaridad de bancos (nM)} = \frac{\text{Concentración de bancos (ng/μl)}}{\text{Tamaño medio en pares de bases} \times 649,5} \times 10^6$$

2. Diluya cada grupo capturado a 10 nM.
3. Deje descongelar el grupo de SGC generado en 5.3.1.
4. Para generar el grupo de secuenciación, combine cada grupo capturado con su grupo de SGC correspondiente mezclando 3,3 μl del grupo capturado con 6,7 μl del grupo de SGC.
5. Si se procesan varios grupos de secuenciación, mézclelos en igual cantidad (por ejemplo, 5 μl de cada) siguiendo la tabla de recomendación de secuenciación que aparece a continuación:

TIPO DE KIT DEL SISTEMA NEXTSEQ 500/550	NÚMERO DE MUESTRAS POR SECUENCIACIÓN
Rendimiento medio	8 muestras (1 grupo)
Rendimiento alto	24 muestras (3 grupos)

6. Mezcle bien y utilice esta dilución de acuerdo a la recomendación de desnaturalización estándar de Illumina®.
7. Para la dilución de carga, consulte la tabla siguiente:

TIPO DE KIT DEL SISTEMA NEXTSEQ 500/550	DILUCIÓN DE CARGA
Rendimiento medio	1,3 pM
Rendimiento alto	1,4 pM
[Ajuste la dilución (intervalo de 1,1 pM a 1,5 pM) según el número de clústeres obtenidos en la primera tanda]	



8. Para las lecturas por muestra recomendadas, consulte la tabla siguiente:

LONGITUD DE LECTURA (EN BP)	TOTAL DE LECTURAS POR MUESTRA RECOMENDADAS	PARES DE LECTURAS (FRAGMENTOS) POR MUESTRA RECOMENDADAS
2 X 150	32 millones	16 millones

Nota: Al aumentar el número de lecturas por muestra, se espera obtener identificaciones de variantes más fiables y sensibles, especialmente en regiones que, de lo contrario, tendrían poca profundidad de lectura. Consulte la Sección 9. *Advertencias, limitaciones y precauciones.*



6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

6.1. Demultiplexación de datos de SNG

El usuario debe realizar la demultiplexación de datos de SNG según las instrucciones proporcionadas en la guía del usuario del secuenciador NextSeq® 500/550 de Illumina® (p. ej., guía de los sistemas NextSeq® 550, n.º de documento 15069765 v07). Tal como indica Illumina®, la demultiplexación independiente de análisis de terceros se puede llevar a cabo con bcl2fastq v2.0 o versiones posteriores (Guía del software bcl2fastq2 Conversion Software v2.20, n.º de documento 15051736 v03).



Nota: Los usuarios deben tener en cuenta que el uso de la opción de no división de carriles en bcl2fastq o el uso de otros flujos de trabajo de demultiplexación automatizada puede resultar en nombres de archivo no compatibles con el SOPHiA DDM™ Dx Mode. Consulte el Manual del usuario del SOPHiA DDM™ Dx Mode para obtener instrucciones claras.

6.2. Carga y análisis de datos

El usuario inicia sesión en SOPHiA DDM™ Dx Mode y selecciona la SOPHiA DDM™ Dx Homologous Recombination Deficiency Solution en la ventana «My product(s)» para iniciar la carga de datos de SNG. Para crear una nueva solicitud para el análisis genómico, consulte la sección «Crear una solicitud de análisis» en el Manual del usuario de SOPHiA DDM™ Dx Mode para DIV a fin de obtener más instrucciones. Tras completar el análisis, los usuarios recibirán una notificación por correo electrónico. Si no se recibe ninguna notificación antes de 24 horas desde el inicio del proceso de carga de datos, los usuarios deben contactar con el servicio de asistencia.



Nota: Todas las muestras de la nueva solicitud de análisis se deben haber procesado con el experimento de secuenciación y preparado con los mismos reactivos de ensayo.

6.3. Generación de informes

Después de cargar correctamente los archivos de secuenciación (FASTQ), el progreso del análisis se puede supervisar en el widget «My Genomic Analysis Requests» en el panel de control o desde el navegador. Una vez completado, es posible acceder al informe de SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution generado de cada muestra en la solicitud, así como descargarlo en formato PDF. El Manual del usuario del SOPHiA DDM™ Dx Mode se puede utilizar para obtener instrucciones detalladas sobre el análisis.



CE-IVD Report
2022, Mar 18

SOPHiA DDM Dx Homologous Recombination Deficiency Solution Report

Patient ID
patient1

Sample ID
HRD-70

// Homologous Recombination Deficiency

SOPHiA DDM Dx HRD status
POSITIVE

// Genomic Integrity

Genomic Integrity Status
Positive

Genomic Integrity Index
16.6

Genomic Integrity QA Status
High

// Analysis

Request name
Trial

CE-IVD Product
SOPHiA DDM Dx Homologous Recombination Deficiency Solution

SOPHiA DDM Dx version
0.0.0

Signature _____

// Intended purpose

The SOPHiA DDM Dx Homologous Recombination Deficiency Solution is an in vitro diagnostic medical device that can be used as an aid to determine the Homologous Recombination Deficiency (HRD) status of tumors in patients with ovarian cancer by the semi-quantitative detection of the Genomic Instability biomarker. The device is intended to be used by healthcare professionals and is based on a next generation sequencing (NGS) workflow taking genomic DNA extracted from FFPE treated tumor material as input.

Request number: 12345 Patient ID: patient1
Report date: 2022, Mar 18 10:00:12 Sample ID: HRD-70

1 / 1

Figura 2. Ejemplo de un informe de la SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution.

En el informe de la SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution se muestra: el estado de SOPHiA DDM™ Dx HRD, el estado de integridad genómica, el índice de integridad genómica y el estado del control de calidad de la integridad genómica. En la *Tabla 2* de la página 42 se ofrece una visión general de los posibles resultados.



Tabla 2. Posibles resultados del informe de la SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution

Estado de SOPHiA DDM™ Dx HRD	Estado de integridad genómica	Estado del control de calidad de integridad genómica	Descripción
Positive	Positive	High	Identificación positiva de alta confianza.
Positive	Positive	Medium	Identificación positiva de alta confianza. Los datos de la SNG satisfacen los criterios de calidad requeridos para considerar una muestra como positiva. No obstante, la calidad de los datos de la SNG es deficiente o el contenido tumoral de la muestra es bajo.
Negative	Negative	High	Identificación negativa de alta confianza.
Negative	Negative	Medium	Identificación negativa de alta confianza. Los datos de la SNG satisfacen los criterios de calidad requeridos para considerar una muestra como negativa. No obstante, la calidad de los datos de la SNG es deficiente o el contenido tumoral de la muestra es bajo.
Negative	Negative*	Medium	Identificación negativa de confianza media con mayor riesgo de negativo falso. Los datos de la SNG no satisfacen los criterios de calidad requeridos para considerar una muestra como negativa con alta confianza. La relación señal/ruido en los datos de SNG es baja, lo que podría reflejar un contenido tumoral insuficiente en la muestra. Se recomienda garantizar que la muestra de ADN satisface los requisitos de contenido tumoral y de calidad del ADN.
Undetermined	Inconclusive	Medium	No es posible determinar el estado de SOPHiA DDM™ Dx HRD porque la relación señal/ruido es insuficiente en los datos de la SNG utilizados para el análisis de integridad genómica. Este resultado puede reflejar la ausencia de grandes alteraciones en el número de copias en la muestra o bien un contenido tumoral insuficiente en la muestra. Se recomienda repetir el experimento con una nueva muestra de ADN y garantizar que su contenido tumoral y su calidad sean suficientes.
Undetermined	Rejected	Low	No es posible determinar el estado de SOPHiA DDM™ Dx HRD porque los datos de la SNG utilizados para el análisis de integridad genómica no tienen la calidad suficiente. Se recomienda repetir el experimento garantizando que el contenido tumoral de la muestra y la calidad del ADN sean suficientes y siguiendo las instrucciones del protocolo.



7. DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS Y PARÁMETROS

7.1. Archivos de recursos

La alineación se realiza según el genoma de referencia GRCh37 (también denominado hg19). Las fuentes disponibles públicamente para todos estos requisitos se encuentran en:

Genoma de referencia GRCh37 – hg19:

https://storage.googleapis.com/genomics-public-data/references/b37/Homo_sapiens_assembly19.fasta.gz

7.2. Procesamiento previo de datos sin procesar

Procesamiento previo

- Recopile parámetros de calidad en función de archivos fastq sin procesar.
- Trunque los archivos fastq a un tamaño máximo de 2500 MB.

Alineación

- Corte los adaptadores y recorte los extremos de baja calidad de las lecturas (calidad de base inferior a 20).
- Alinee las lecturas al genoma de referencia hg19 en el modo de ambos extremos.
- Calcule las estadísticas de alineación y parámetros de cobertura en los archivos de alineación sin procesar.
- Recorte las secuencias de adaptadores voladizos.

7.3. Análisis de integridad genómica

El análisis de integridad genómica aspira a detectar HRD evaluando el grado de inestabilidad genómica. La reparación por recombinación homóloga funcional se requiere para una reparación sin errores de ruptura de la doble cadena y para mantener la integridad genómica. Una consecuencia de la HRD es la pérdida de la integridad genómica por la acumulación de anomalías genómicas debido a la incapacidad de la célula de reparar las rupturas de la doble cadena. Nuestro análisis de integridad genómica aspira a evaluar estas anomalías genómicas a través de la secuenciación genómica completa (SGC). Más concretamente, nuestro método utiliza un algoritmo de aprendizaje profundo entrenado específicamente para reconocer patrones de inestabilidad genómica en el perfil de cobertura de SGC. El algoritmo analiza los datos de SGC de baja cobertura y genera un índice de integridad genómica (IG) que refleja el grado de dicha integridad. Un índice de IG superior a 0 indica una integridad genómica baja. Un índice de IG inferior a 0 indica una integridad genómica alta.

Durante el análisis de IG, se realizan estos pasos del algoritmo de forma secuencial para cada muestra de interés: primero, los datos de la SGC de baja cobertura se preprocesan y se someten a una evaluación de calidad, luego, se calcula el índice de IG y, por último, se asigna un estado de IG a la muestra. Estos pasos se describen en las secciones siguientes.



Paso 1: Preprocesamiento de datos y evaluación de calidad de la muestra:

1. Las lecturas de ambos extremos de SGC se asignan al genoma humano de referencia y se procesan para recortar los adaptadores y las identificaciones de bases de baja calidad. El perfil de cobertura de SGC se calcula y se normaliza.
2. El perfil de cobertura de SGC normalizado se somete a un control de calidad según los parámetros definidos al final de esta sección. Uno de los siguientes estados de control de calidad de IG se asigna a la muestra:
 - **Calidad alta:** la calidad de los datos es suficiente para calcular con seguridad un índice de IG y un estado de IG.
 - **Calidad media:** la calidad de los datos es inferior (en comparación con la calidad alta) y, por tanto, es posible que el algoritmo de aprendizaje profundo no calcule correctamente un índice de IG.
 - **Calidad baja:** la calidad de los datos no satisface los criterios requeridos para calcular un índice de IG.

Paso 2: Cálculo del índice de IG:

El índice de IG se obtiene al procesar el perfil de cobertura de SGC normalizado con un algoritmo de aprendizaje profundo propio entrenado para reconocer patrones de inestabilidad genómica.

Paso 3: Determinación del estado de IG:

Un estado de IG que se aplica a las muestras de cáncer de ovario se determina al combinar el estado del control de calidad de la muestra con el índice de IG. Pueden darse cinco resultados:

- **IG positivo:** muestras con un índice de IG mayor o igual que 0.
- **IG negativo:** muestras con un índice de IG menor que 0.
- **IG negativo*:** muestras con un índice de IG menor que 0, pero con mayor riesgo de identificaciones negativas falsas debido a una baja relación señal/ruido.
- **IG no concluyente:** muestras de calidad media en las que el algoritmo de aprendizaje profundo no calculó correctamente un índice de IG debido a una relación señal/ruido insuficiente.
- **IG rechazado:** muestras de calidad baja desestimadas en el análisis de IG. Las muestras se rechazan si el número de fragmentos de ADN disponibles para el cálculo del perfil de cobertura de SGC es insuficiente, si el ruido del perfil de cobertura de SGC es excesivo o si la proporción de valores atípicos de la cobertura es excesiva.

Definición de parámetros de control de calidad e IG

- **Nº total de fragmentos:** número total de fragmentos de ADN (lecturas de ambos extremos) correctamente asignados.
- **Número de fragmentos de SGC:** número total de fragmentos de ADN disponibles para el cálculo del perfil de SGC de cobertura sin procesar. Se excluyen los fragmentos de ADN asignados a las regiones genómicas enriquecidas para la identificación de variantes. Este parámetro de control de calidad se compara con un umbral de 4 millones para determinar el estado de control de calidad de IG.
- **Porcentaje de fragmentos de SGC:** fracción del total de fragmentos de SGC respecto al número total de fragmentos.
- **Proporción de valores atípicos de la cobertura:** porcentaje de regiones de SGC que se tienen en cuenta para el análisis de IG y que presentan una cobertura localizada excesiva y con artefactos, que se compensa con el



algoritmo de normalización de la cobertura. Este parámetro de control de calidad se compara con un umbral del 20 % para determinar el estado de control de calidad de IG.

- **Relación de pureza/ploidia:** relación entre el contenido tumoral de la muestra y su ploidia, que se estima midiendo la intensidad de la señal inducida en el perfil de cobertura de SGC normalizado mediante un cambio en el número de copias. El parámetro de control de calidad de IG se compara con un umbral de 0,1 (que sugiere bajo contenido tumoral) para determinar el estado de control de calidad de IG. La incapacidad de medir la relación de pureza/ploidia de los datos también se utiliza para determinar el estado de control de calidad de IG.
- **Ruido residual:** el ruido residual se calcula midiendo la desviación estándar del perfil de cobertura de SGC normalizado en relación con el perfil de cobertura de SGC suavizado. Este parámetro de control de calidad se compara con un umbral de 0,17 para determinar el estado de control de calidad de IG.
- **RSR:** intensidad de la señal inducida en el perfil de cobertura de SGC normalizado mediante todas las anomalías del número de copias presentes en la muestra dividido entre el ruido residual. Este parámetro de control de calidad de IG se compara con un umbral de 0,55 para determinar el estado de control de calidad de IG. El algoritmo también tiene en cuenta la RSR para asignar los estados de IG negativo* e IG no concluyente.
- **Estado de control de calidad:** estado de la evaluación de la calidad de IG de una muestra.
- **Índice de IG:** el índice de IG es un valor escalar que oscila entre -20 y 20, lo cual refleja el grado de integridad genómica. Los índices de IG elevados reflejan un bajo grado de integridad genómica. Los índices de IG bajos reflejan un alto grado de integridad genómica.
- **Estado de IG:** el estado de integridad genómica de una muestra.

7.4. Cálculo del estado de SOPHiA DDM™ Dx HRD

El pipeline bioinformático calcula el estado de SOPHiA DDM™ Dx HRD en función del estado de integridad genómica según la tabla siguiente.

Estado de integridad genómica	Estado de SOPHiA DDM™ Dx HRD
Positive	Positive
Negative	Negative
Negative*	Negative
Inconclusive	Undetermined
Rejected	Undetermined



8. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD

8.1. Evaluación de la calidad analítica

8.1.1. Concordancia del estado de integridad genómica con el ensayo de SNG comparativo

La calidad analítica del estado de integridad genómica se determinó en 238 muestras de ADN extraídas de piezas de biopsia FFPE de cáncer de ovario con DQN ≥ 3 , secuenciadas en NextSeq® 550 de Illumina®, para las que se obtuvo un resultado de inestabilidad genómica concluyente en el ensayo de SNG comparativo.

De las 238 muestras incluidas en el análisis, 5 derivaron en un estado de integridad genómica no concluyente (tasa de rechazo: 2,1 %). En la tabla siguiente se muestra la calidad calculada sobre las 233 muestras restantes para las que se obtuvo un estado de integridad genómica concluyente.

Parámetro	Valor
Porcentaje de concordancia positiva (PPA)	92,9 %
Porcentaje de concordancia negativa (NPA)	95,8 %
Porcentaje de concordancia general (OPA)	94,4 %

8.1.2. LD del estado de la integridad genómica del contenido tumoral

El límite de detección del estado de la integridad genómica respecto al contenido tumoral de la muestra se determinó midiendo el contenido tumoral más bajo para el cual la sensibilidad es superior o igual al 95 %. El LD medido fue del 28,5 % de contenido tumoral.

8.1.3. Repetibilidad del estado de la integridad genómica

La repetibilidad del estado de la integridad genómica se determinó según los resultados obtenidos en experimentos independientes con varias muestras.

Característica	Repetibilidad del estado de IG	Desviación estándar del índice de IG (promedio / intervalo entre muestras)
Repetibilidad	100%	0,26 / [0,23 - 0,32]



8.1.4. Reproducibilidad del estado de la integridad genómica

La reproducibilidad del estado de la integridad genómica se determinó según los resultados obtenidos por laboratorios independientes a los que se les proporcionó alícuotas de las mismas muestras de referencia.

Característica	Reproducibilidad del estado de IG	Desviación estándar del índice de IG (promedio / intervalo entre muestras)
Reproducibilidad entre tandas	100%	0,47 / [0,00 - 1,48]
Reproducibilidad entre centros	100%	1,00 / [0,43 - 2,14]
Reproducibilidad entre partidas	100%	-

8.1.5. Interferencias endógenas y exógenas

Se realizó una evaluación de riesgos para valorar el impacto potencial de las sustancias interferentes endógenas y exógenas en la calidad del ensayo. Se identificaron posibles interferentes a partir de la bibliografía y de productos similares basados en la SNG.

Varias sustancias (por ejemplo, proteinasa K, formol, hemoglobina, colorantes para marcar tejidos, etanol) son inhibidores conocidos de las reacciones enzimáticas utilizadas en la preparación de bancos de ADN. En concentraciones suficientemente altas, estas podrían reducir la eficacia enzimática y derivar en el fracaso de la prueba («No result»), pero no a identificaciones incorrectas de variantes o a una clasificación errónea del estado de IG. No se observó que otras sustancias evaluadas (por ejemplo, triglicéridos, parafina, xileno) interfirieran en el flujo de trabajo del ensayo.

No se identificaron mecanismos por los que las sustancias interferentes pudieran causar resultados falsos positivos o falsos negativos del estado de IG. En conclusión, se espera que la presencia de sustancias interferentes, si las hay, aumente la probabilidad de fallo del ensayo, pero no repercute en la especificidad analítica ni en la determinación del estado de IG.

8.1.6. Arrastre y contaminación cruzada

Los riesgos vinculados a los eventos de arrastre entre ciclos y entre muestras, así como la posible reacción cruzada, se abordaron y mitigaron mediante estrategias tanto experimentales como informáticas.

Los riesgos de arrastre se evaluaron mediante investigaciones del funcionamiento del secuenciador NextSeq550, la implementación de los procedimientos de control de calidad existentes y el análisis de conjuntos de datos que simulaban procesos de arrastre. Paralelamente, se mitigaron los riesgos de reacción cruzada mediante el diseño del algoritmo implementado en la SOPHiA DDM Dx HRD Solution para el cálculo del índice de IG y el estado de IIG, que garantiza la solidez frente a patrones de cobertura genómica que, de otro modo, podrían dar lugar a asignaciones erróneas. La solidez de este algoritmo se confirmó además mediante análisis de valores atípicos de cobertura seleccionados de forma aleatoria y específica, que no afectaron a la precisión de la determinación del estado de IIG. En conjunto, las pruebas generadas en esta evaluación de riesgos indican que ni los eventos de arrastre ni los de reacción cruzada representan un riesgo significativo para los procesos de identificación de variantes e identificación del estado de IIG implementados como parte de la SOPHiA DDM Dx HRD Solution.



8.2. Evaluación de calidad clínica

La calidad clínica de la SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution se determinó en un estudio clínico observacional retrospectivo en 110 extractos de ADN derivados de FFPE de material tumoral. Todas las muestras derivaban de cánceres de ovario. El contenido tumoral determinado de todas las muestras oscilaba del 30 % al 90 %. La calidad de los extractos de ADN se evaluó mediante determinación DQN en el analizador de fragmentos (Agilent Technologies, Inc.) con 300 bp como umbral. Todos los extractos de ADN tienen un DQN > 3, 105 extractos de ADN tienen un DQN > 5, 5 extractos de ADN tienen un DQN ≤ 5.

El estado de HRD de referencia de todas las muestras se determinó mediante un método genómico de DIV comercializado que combina la inestabilidad genómica y el análisis de mutaciones de BRCA1/BRCA2. Al comparar este estado de HRD de referencia con el estado de SOPHiA DDM™ Dx HRD definido en el estudio clínico, se pudo calcular la sensibilidad diagnóstica, la especificidad diagnóstica, los valores predictivos positivo y negativo y el cociente de verosimilitudes positivo y negativo. De las 110 muestras, 15 de ellas se excluyeron de los cálculos por resultados no válidos: 8 muestras presentaban el estado Undetermined de SOPHiA DDM™ Dx HRD, 12 muestras presentaban el estado Failed del HRD de referencia y 5 muestras presentaban un estado no válido para ambos métodos.

Parámetro	Valor (IC del 95 %)
Sensibilidad diagnóstica	80,9 % [67,5 %-89,6 %]
Especificidad diagnóstica	93,7 % [83,2 %-97,9 %]
Valor predictivo positivo	92,7 %
Valor predictivo negativo	83,3 %
Cociente de verosimilitudes positivo	12,9
Cociente de verosimilitudes negativo	0,2



9. ADVERTENCIAS, LIMITACIONES Y PRECAUCIONES

9.1. Advertencias

- Solo para diagnóstico in vitro. Las decisiones sobre el cuidado y tratamiento de los pacientes se deben basar en el criterio médico independiente del facultativo, teniendo en cuenta toda la información aplicable relacionada con el estado del paciente, por ejemplo, los antecedentes familiares y del paciente, exploraciones físicas, información de otras pruebas diagnósticas y las preferencias del paciente, de acuerdo al tratamiento de referencia de una comunidad determinada.
- La SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution se ha validado en ADN extraído de muestras de FFPE de cáncer de ovario con DQN ≥ 3 (medido con el sistema Agilent Fragment Analyzer™), con contenido tumoral ≥ 30 %, y secuenciadas en NextSeq® 500/550 de Illumina®.
- Una mala calidad de los datos de SNG sin procesar puede entorpecer el análisis de los datos y provocar positivos falsos, negativos falsos y resultados no concluyentes.
- Los usuarios deben verificar que la calidad de las muestras de ADN cumple los criterios mínimos para la cualificación:
 - Contenido tumoral ≥ 30 %
 - DQN ≥ 3 , medido con el sistema Agilent Fragment Analyzer™
 - 50 ng o 100 ng de DNA de entrada en función del DQN (consulte el protocolo)
- Se vigilaron los dispositivos para la electroforesis en gel de alta resolución distintos del sistema Agilent Fragment Analyzer™ (p. ej., Agilent TapeStation) en caso de que derivasen en una estimación sesgada del DQN en muestras de ADN de FFPE. El Agilent Fragment Analyzer™ System es el único dispositivo apto para cualificar las muestras de la SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution.
- El procesamiento de muestras no aptas podría derivar en resultados erróneos. SOPHiA GENETICS no se hace responsable de los resultados y decisiones consiguientes tomadas en base a estos resultados.
- Un DQN mayor o igual que 3 no descarta la presencia de otros problemas de calidad en la muestra de ADN. Puesto que la exactitud del análisis depende de la calidad y cantidad de ADN, los usuarios deben garantizar que todo el flujo de trabajo utilizado para obtener el ADN de entrada sea compatible con el ensayo antes de continuar con los análisis clínicos.
- El estado de SOPHiA DDM™ Dx HRD se basa exclusivamente en los resultados del análisis de la integridad genómica y no tiene en cuenta el estado de las mutaciones de otros genes. Un estado negativo de SOPHiA DDM™ Dx HRD no excluye la presencia de mutaciones en otros genes.



9.2. Limitaciones

- El producto está diseñado para procesar el volumen de datos generado por una sola secuenciación de NextSeq® 500/550 de Illumina® (cubetas de lectura de rendimiento medio y rendimiento alto). El tamaño máximo de solicitud no puede superar 200 GB. El tamaño máximo de archivo por muestra no puede superar 50 GB. El pipeline realiza un submuestreo de lectura aleatorio en todas las muestras que superen los 5 GB de los archivos fastq comprimidos.
- Incluso si se siguen las recomendaciones de multiplexación de las muestras, el número total de lecturas puede ser insuficiente como para ofrecer resultados concluyentes por varios motivos, como una calidad deficiente de la muestra, calidad deficiente de los datos de SNG, asignación de lectura desigual significativa entre SGC y bancos capturados o asignación de lectura desigual significativa entre muestras multiplexadas en la misma secuenciación.
- El producto no detecta ni informa de eventos de contaminación cruzada entre muestras.
- La realización incorrecta de la extracción de ADN, preparación de bancos o secuenciación puede derivar en el rechazo de la muestra, así como en resultados positivos falsos y negativos falsos.
- La realización incorrecta del paso de captura puede derivar en el rechazo de la muestra debido a una cobertura de lectura demasiado alejada del objetivo.
- El producto no mide ni informa del contenido tumoral de la muestra.
- El límite de detección del estado de SOPHiA DDM™ Dx HRD y la determinación del estado de la integridad genómica es un contenido tumoral del 30 %. El procesamiento de muestras con un contenido tumoral <30 % puede resultar en resultados de IG no concluyente o IG negativo*, pero también en negativos falsos.
- Las muestras con un estado negativo de SOPHiA DDM™ Dx HRD y estado de IG negativo* se asocian con un valor predictivo negativo inferior.
- Los datos de SGC de baja cobertura no permiten distinguir de forma fiable las muestras sin grandes alteraciones en el número de copias de las muestras con contenido tumoral insuficiente. El procesamiento de las muestras que no presentan grandes alteraciones en el número de copias derivará en resultados de IG no concluyente.
- El parámetro de control de calidad de IG y el índice de IG que se notifican a los usuarios finales se obtienen redondeando al primer o segundo decimal (según el parámetro) los valores de precisión total utilizados para los cálculos del estado del control de calidad y el estado de IG.



9.3. Precauciones

- Los estándares y procedimientos de buenas prácticas de laboratorio, además de seguir rigurosamente las IdU, se requieren para una calidad adecuada del producto. Cualquier variación respecto a las instrucciones en relación con el manejo de las muestras, el protocolo del laboratorio, la multiplexación y la secuenciación podría afectar negativamente a la calidad de los datos de SNG sin procesar.
- Se deben utilizar áreas separadas físicamente de pre-PCR y post-PCR para evitar la contaminación de las muestras de ADN.
- Se deben utilizar pipetas calibradas correctamente y equipos de laboratorio adecuados para llevar a cabo el experimento.
- No se deben mezclar diferentes números de lote de reactivos.
- Almacene y manipule los reactivos según las instrucciones de los envases de los kits y no los utilice si han caducado.
- Es posible que algunos reactivos requieran precauciones especiales. Para obtener información específica sobre la seguridad, consulte las Fichas de datos de seguridad (FDS) correspondientes de cada componente del producto.
- La concentración recomendada de EDTA en el tampón de almacenamiento de ADN es de 0,1 mM. Un exceso de EDTA en los tampones de almacenamiento de la muestra podrían perjudicar al procesamiento de las muestras.
- Para obtener instrucciones detalladas sobre el software, consulte el Manual del usuario del SOPHiA DDM™ Dx Mode.



10. SÍMBOLOS

Símbolo	Título
	Consultar instrucciones de uso
	Número de catálogo
	Código de lote (Número de lote)
	Precaución
	Fabricante
	Límite de temperatura
	Fecha de caducidad
	Conformidad europea
	Representante autorizado en la Unión Europea
	Contiene suficiente para <n> ensayos
	Importador
	Consulte la Sección 5: Advertencias y precauciones .
	Consulte la Sección 5: Advertencias y precauciones .
	Consulte la Sección 5: Advertencias y precauciones .
	Consulte la Sección 5: Advertencias y precauciones .
	Consulte la Sección 5: Advertencias y precauciones .
	Box 1
	Box 2



11. ASISTENCIA

En caso de dificultad a la hora de utilizar SOPHiA DDM™, consulte la sección «Resolución de problemas» del Manual del usuario del SOPHiA DDM™ Dx Mode o póngase en contacto con nuestra línea de asistencia llamando al +41 21 694 10 60 o escribiendo un correo electrónico a support@sophiagenetics.com. Visite www.sophiagenetics.com para obtener más información. También se puede solicitar asistencia mediante solicitud web desde la pantalla Dashboard de la sección Support de SOPHiA DDM™.

Cualquier incidente grave que se produzca en relación con el producto se debe comunicar a la mayor brevedad a SOPHiA GENETICS y a las autoridades competentes del Estado miembro donde se encuentre el usuario o paciente.



ANEXO I. PLACAS DE CEBADORES DE INDEXADO DOBLE ÚNICOS

Cebadores de indexado doble únicos V2 compatibles con 32 Illumina® en formato de placa de 96 pocillos (7 µl cada uno)

	1	2	3	4	5	6	7	...	12
A	sgUDI-49	sgUDI-57	sgUDI-65	sgUDI-73					
B	sgUDI-50	sgUDI-58	sgUDI-66	sgUDI-74					
C	sgUDI-51	sgUDI-59	sgUDI-67	sgUDI-75					
D	sgUDI-52	sgUDI-60	sgUDI-68	sgUDI-76					
E	sgUDI-53	sgUDI-61	sgUDI-69	sgUDI-77					
F	sgUDI-54	sgUDI-62	sgUDI-70	sgUDI-78					
G	sgUDI-55	sgUDI-63	sgUDI-71	sgUDI-79					
H	sgUDI-56	sgUDI-64	sgUDI-72	sgUDI-80					

Secuencias indexadas para los cebadores de indexado doble únicos compatibles con Illumina®

Índice	Secuencias i5 de hoja de muestras NextSeq	i7
sgUDI-49	CAGTGAGC	ACCAAGGA
sgUDI-50	CAATCCTG	CAGACCTG
sgUDI-51	AACTAGAC	CGAGCAAC
sgUDI-52	GCCATTCA	TCTTGACT
sgUDI-53	ATTGTCGT	GACAATGG
sgUDI-54	TGGCGTTC	GTTCTACG
sgUDI-55	CAGGACAG	AACGCTGC
sgUDI-56	GTCCTTAT	GGACATCA
sgUDI-57	GGAATGTA	TTGAGCTC
sgUDI-58	AGCTAACC	ACGTTGAG
sgUDI-59	TCAGCAGG	CTTCAGGA
sgUDI-60	GATTGAGG	TGCCAACT
sgUDI-61	ATTCTTCG	AGGTCATG
sgUDI-62	CTCGACTA	TACTAGCA
sgUDI-63	GTGAGGAT	GTAAGTGT
sgUDI-64	ACTGCAGC	TGAGTTGA



Índice	Secuencias i5 de hoja de muestras NextSeq	i7
sgUDI-65	CGATTGCC	CCTTAGAC
sgUDI-66	TAAGATGC	TATCGCCA
sgUDI-67	TTCAGCAC	GCAGAACA
sgUDI-68	GCGTCAAT	AGGAATGC
sgUDI-69	AATGCGGC	CGTGAGGT
sgUDI-70	TGACTACA	CAATTCAG
sgUDI-71	TCGGAGGA	GGTCCTTC
sgUDI-72	CTCGATTG	TTCCGGCA
sgUDI-73	CGGACTTA	ATGCCTGA
sgUDI-74	AACTGTCC	TCCAGGAC
sgUDI-75	TCACTCAA	GCTGTCAC
sgUDI-76	ATGTTACG	CGACGATT
sgUDI-77	ACTGCGTA	TCGCAACG
sgUDI-78	GGTCAGGT	GAGTTGTA
sgUDI-79	TCAGGTGG	CGCTAAGG
sgUDI-80	CACGGTGA	TTGCGTGC



ANEXO II. FLUJO DE TRABAJO GENERAL: SOLUCIONES DE CAPTURA SOPHIA DDM™



PREPARACIÓN DE BANCOS

Con SOPHiA GENETICS™ Dx DNA Library Prep Kit III



CAPTURA

FLUJO DE TRABAJO SENCILLO

- SOLO 1-2 TUBOS A MANIPULAR (BANCOS AGRUPADOS MÚLTIPLES)
- SOLO 3 HORAS DE TRABAJO PRÁCTICO



Document Approvals
Approved Date: 28 Jan 2026

Approval Verdict: Approve	Coleman Spence, (cspence@sophiagenetics.com) Regulatory Approval 28-Jan-2026 01:06:24 GMT+0000
QA Approval Verdict: Approve	Claire Mullane, (cmullane@sophiagenetics.com) Quality Assurance Approval 28-Jan-2026 08:54:06 GMT+0000