

INSTRUCCIONES DE USO

16, 32, 48 Y 96 MUESTRAS

SOPHiA DDM™ Dx **Myeloid Solution**



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





INFORMACIÓN DE RESUMEN

Nombre de producto	SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution
Tipo de producto	Solución en paquete
Familia de productos	Aplicación de diagnóstico molecular (kit + análisis)
ID del algoritmo	ILL1XG1S9_CNV
ID del panel de genes	MYS_v1
Versión del producto	1,0
Tipo de muestra	ADN somático aislado de sangre
Secuenciador	Illumina - MiSeq
Descripción de la GMDN	Software de interpretación de kit de reactivos de análisis del genoma humano/DIV
ID del documento	SG-00679
Versión del documento	v6.0
Fecha de modificación	27 de enero de 2026

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



SOPHiA GENETICS SA
ZA La Pièce 12
1180 Rolle
Switzerland



BS0103ILLCSML01-016
BS0103ILLCSML01-032
BS0103ILLCSML01-048
BS0103ILLCSML01-96



SOPHiA GENETICS SAS
Technopole Izarbel
158 allée Fauste d'Elhuyar
F-64210 Bidart, France





CÓDIGOS DE PRODUCTO

	CÓDIGO COMPLETO DEL PRODUCTO	BOX 1	BOX 2	KIT DE PREPARACIÓN DE BANCOS
REF	BS0103ILLCSML01-016	B1.01.0003.C-16	B2.0003.C-16	700232
	BS0103ILLCSML01-032	B1.01.0003.C-32	B2.0003.C-32	700232
	BS0103ILLCSML01-048	B1.01.0003.C-48	B2.0003.C-48	700234
	BS0103ILLCSML01-96	B1.01.0003.C-96	B2.0003.C-48	700234



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.

KAPA™ es una marca comercial de Roche.

QIAseq® es una marca registrada de Qiagen.

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-00679 – 6.0	27 de enero de 2026	SG-00658 – 8.0	- Cambio en el sistema de numeración de versiones, sin versiones adicionales entre la versión 5.5 y la versión 6.0. - 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 de las indicaciones de enfermedad; actualización del nombre del componente de preparación del banco. - Sección 3: Eliminación de los componentes fuera de alcance, aplicación de escritorio SOPHiA DDM de la descripción. - Advertencias y precauciones: Adición del número de identificación CAS y la concentración de cada componente peligroso enumerado. - Eliminación de limitaciones fuera de alcance. - Eliminación de instrucciones fuera de alcance de la sección Componentes del producto. - Eliminación de la sección Resumen y explicación del ensayo.
SG-00679 – 5.5	23 de mayo de 2025		- Anexo 1: Se ha eliminado la tabla «16 adaptadores de indexado doble compatibles con Illumina® en formato de placa de 96 pocillos (7 µl cada uno)» del Anexo I debido a la interrupción del formato de placa de 16 adaptadores de indexado doble. - Sección 5.1.1 Contenido del kit – BOX 1: Se ha actualizado para reflejar el cambio anterior.
SG-00679 – 5.4	19 de marzo de 2025		Sección 5.1.1 Contenido del kit – BOX 1: Se ha aumentado el volumen de contenido del 2x Hybridization Buffer de 50 µl a 75 µl; se ha aumentado el volumen de contenido del Hybridization Buffer Enhancer de 20 µl a 30 µl.
SG-00679 – 5.3	14 de agosto de 2024		«Aplicación web SOPHiA DDM™» se ha cambiado a «modo SOPHiA DDM™ Dx» - Reformulaciones menores relacionadas con el cambio anterior
SG-00679 – 5.2	8 de julio de 2024		- Se ha actualizado la dirección del representante en la CE - Reducción del volumen de contenido de las sondas de hibridación SOPHiA GENETICS de 20 µl a 18 µl (consulte la sección 5.1.1 Contenido del kit – BOX 1)



ID DEL DOCUMENTO/ VERSIÓN	FECHA	Versión de las Instrucciones de Uso equivalente en ingles	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO
			Se ha eliminado la propiedad intelectual de terceros proveedores de las secciones 5.1.1 <i>Contenido del kit</i>, 5.3.1 <i>Agrupamiento de bancos</i> y 5.3.2 <i>Hibridación</i>
SG-00679 – 5.1	9 de enero de 2023		Corrección de errores de formato
SG-00679 – 5.0	14 de septiembre de 22		- Símbolo de marca registrada añadido a SOPHiA DDM y SOPHiA GENETICS. - Nombre Library Prep Kit modificado a SOPHiA GENETICS™ Dx en todo. - Versión del documento actualizada al siguiente número entero sin ningún decimal.
SG-00679 – 4.5	19 de abril de 2022		Se han añadido las instrucciones de la aplicación web SOPHiA DDM™
SG-00158 - 4.4	14 de abril de 2022		- Limitaciones y advertencias: Modificado - Dirección de la sede de SOPHiA GENETICS actualizada - Cambios en el laboratorio de investigación como se recomienda globalmente - Cambios menores y correcciones de errores tipográficos
ID-60101-17 - 4.3	21 de julio de 2021		- Página 2: ID de documento corregido. - Páginas 2 y 29: cambios estéticos. - Página 17: orden de pasos cambiado. - Página 26: volumen de premezcla de PCR para 48 muestras corregido.
ID-60101-17 - 4.2	16 de junio de 2021		- Página 3: marca comercial modificada. - Página 44: añadido menor en las especificaciones del archivo. - Páginas 55 y 56: eliminado el error tipográfico del encabezado «Unique»
ID-60101-17 - 4.1	28 de mayo de 2021		- Página 2: tabla de información de resumen modificada. - Página 3: descargo de responsabilidad modificado. - Páginas 11, 13, 15 y 29: encabezado de tabla modificado. - Página 16: secuencia de los pasos 1 y 2 intercambiada. - Página 17: preparación de etanol movido a «Preparación». - Páginas 12, 18, 19, 21, 22, 23, 27, 35, 36, 37, 38 y 43: cambios estéticos y correcciones de errores tipográficos. - Página 20: punto 1, viñeta 2 cambiada de «Potenciador FX» a «Premezcla de reacción FX». - Página 47: viñetas 2 y 18 añadidas, punto 19 modificado.



ID DEL DOCUMENTO/ VERSIÓN	FECHA	Versión de las Instrucciones de Uso equivalente en inglés	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO
ID-60101-17 - 4.0	30 de marzo de 2021		• Página de título, logotipo de la empresa, encabezado, pie de página, última página. • Temas reorganizados. • Se incluyen las instrucciones de instalación, carga y convención de nomenclatura de la aplicación web SOPHiA DDM™. • Combinación de cuatro «Instrucciones de uso» de tamaño de kit para incluir diferentes números de muestras. Se han incluido tablas y se han realizado los cambios apropiados en los casos necesario para este fin. • Se han combinado los siguientes documentos de «Instrucciones de uso» de kits: - PM_CEIVD_B2.1.1.14_r2en - PM_CEIVD_B2.1.1.16_r2en - PM_CEIVD_B2.1.1.18_r2en - PM_CEIVD_B2.1.1.24_r1en • Cambios menores para mayor claridad en las siguientes secciones: • Sección 5.3.1 Agrupamiento de bancos • Sección 5.3.5 Lavar gránulos de estreptavidina para retirar el ADN no unido



ÍNDICE

1. Finalidad/uso previstos	10
2. Descripción general de los principios del ensayo/procedimiento	11
3. Componentes del producto	12
4. Materiales del kit y métodos	13
4.1. Consideraciones iniciales	13
4.1.1. Contenido del kit (16, 32, 48 o 96 muestras)	13
4.1.2. Advertencias y precauciones	15
4.1.3. Material requerido (no suministrado)	17
4.2. Preparación de bancos	19
4.2.1. Preparación de ADN genómico	19
4.2.2. Preparación de reactivos y premezclas	20
4.2.3. Fragmentación enzimática, Reparación de extremos y formación de picos con colas A	22
4.2.4. Unión	23
4.2.5. Purificación posterior a la unión	25
4.2.6. Selección de tamaño doble	26
4.2.7. Amplificación de bancos	27
4.2.8. Purificación post-amplificación	28
4.2.9. Cuantificación de bancos individual y control de calidad	29
4.3. Captura	30
4.3.1. Agrupamiento de bancos	30
4.3.2. Hibridación	31
4.3.3. Preparación de gránulos de estreptavidina	33
4.3.4. Unión de dianas hibridadas a gránulos	34
4.3.5. Lavar gránulos de estreptavidina para retirar el ADN no unido	35
4.3.6. Amplificación post-captura	37
4.3.7. Purificación de amplificación post-captura	38
4.3.8. Cuantificación final de bancos y control de calidad	39
4.4. Secuenciación	40
4.4.1. Preparación de bancos para secuenciación	40
5. Procedimiento de análisis	41
5.1. Instrucciones de instalación del modo SOPHiA DDM™ Dx	41
5.2. Descripción del flujo de trabajo de análisis para la generación de resultados de DIV	41
6. Limitaciones, advertencias y precauciones	42
7. Evaluación de calidad preclínica	45
7.1. MÉTODOS	45
7.2. DATOS	47
7.3. CONCLUSIONES GENERALES	47
7.4. RESULTADOS	49



8. Símbolos 50

9. Asistencia 51

Anexo 1. Placas de adaptadores de indexado doble..... 52

Anexo 2. Equipos de laboratorio utilizados en el laboratorio de SOPHiA GENETICS 55

Anexo 3. Flujo de trabajo general: soluciones de captura SOPHiA DDM™..... 57

Anexo 4. Lista de regiones objetivo y regiones marcadas aplicables 59



1. FINALIDAD/USO PREVISTOS

Este producto está destinado a la identificación de variantes presentes en 30 genes involucrados en la neoplasia mieloide al dirigirse a posiciones específicas susceptibles a mutaciones dentro de la secuencia genómica. La función del producto es servir de ayuda a los profesionales sanitarios para tomar decisiones clínicas relacionadas con neoplasias mieloides y para proporcionar información molecular para un tratamiento adecuado.

El producto está destinado a usarse para el diagnóstico in vitro y únicamente por parte de profesionales.



2. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS PRINCIPIOS DEL ENSAYO/PROCEDIMIENTO

La función confirmada del análisis SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution (MYS) es analizar datos sin procesar de SNG generados por un instrumento MiSeq® de Illumina con un Kit de reactivos MiSeq® v3, en muestras somáticas aisladas de sangre con el Kit de amplificación de bancos KAPA® y SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I.

El SOPHiA DDM™ Dx MYS cuenta con tres pasos principales. El primer paso es calificar la muestra de ADN de sangre que se va a utilizar para el ensayo. El segundo es preparar manualmente las muestras para su secuenciación, lo que se denomina preparación de bancos. La preparación del banco consta de siete pasos clave: la fragmentación del ADN, la unión de adaptadores, la amplificación por PCR de bancos individuales, el agrupamiento de bancos, la hibridación de sondas, la amplificación por PCR en la recogida y después de esta. El tercer procedimiento es secuenciar la muestra preparada mediante química de secuenciación por síntesis (SBS, por sus siglas en inglés) en el secuenciador MiSeq® de Illumina.

Para el análisis, se deben cargar los resultados en la plataforma SOPHiA DDM™ y analizar con la aplicación SOPHiA DDM™ Dx MYS.

Tabla 1: Lista de genes a los que se dirige el producto

ABL1	FLT3	PTPN11
ASXL1	HRAS	RUNX1
BRAF	IDH1	SETBP1
CALR	IDH2	SF3B1
CBL	JAK2	SRSF2
CEBP α	KIT	TET2
CSF3R	KRAS	TP53
DNMT3A	MPL	U2AF1
ETV6	NPM1	WT1
EZH2	NRAS	ZRSR2



3. COMPONENTES DEL PRODUCTO

SOPHiA DDM™ Dx MYS está formado por dos componentes: el kit de SNG y el pipeline bioinformático utilizado en combinación con un accesorio de DIV, el modo SOPHiA DDM™ Dx basado en la nube.

- La finalidad del kit de SNG es preparar y enriquecer los bancos de ADN a partir de muestras de sangre aptas para la secuenciación en un secuenciador MiSeq® de Illumina®. El kit de SNG permite a los usuarios generar datos de secuenciación dirigida. Los elementos se describen en la sección 5 a continuación. Materiales del kit y métodos 5.1. Consideraciones iniciales - 5.1.1 Contenido del kit.
- El pipeline bioinformático («pipeline MYS») procesa los datos sin procesar de SNG mediante algoritmos capaces de evaluar la integridad genómica.
- El modo SOPHiA DDM™ Dx es una aplicación basada en web front-end disponible como un «software como servicio» (SaaS) que se utiliza para generar un informe descargable para los genes mencionados en la Tabla 1 para SNV e INDEL. Existen limitaciones (consulte la sección 7: Limitaciones, advertencias y precauciones).



4. MATERIALES DEL KIT Y MÉTODOS

4.1. 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.

4.1.1. Contenido del kit (16, 32, 48 o 96 muestras)

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

En función del formato del kit, se proporcionan los siguientes componentes:

COMPONENTE	NÚMERO DE ELEMENTOS EN FUNCIÓN DEL FORMATO DEL KIT			
	Kit de 16 muestras	Kit de 32 muestras	Kit de 48 muestras	Kit de 96 muestras
ENVASE 1	1	1	1	2 (48 muestras cada uno)
Adaptadores de indexado doble compatibles con Illumina® (en formato de placa de 96 pocillos incluida en el envase 1)	32	32	48	96 (Placa contenida en uno de los dos envases 1)
ENVASE 2	1	1	1	2 (48 muestras cada uno)
SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I	1	2 (16 muestras cada uno)	1	2 (48 muestras cada uno)

BOX 1 (ALMACENAR ENTRE -25 Y -15 °C)

- Universal Blockers - TS Mix (12 µl)
- Human Cot DNA (25 µl)
- Myeloid Solution probes by SOPHiA GENETICS (18 µl)
- 2x Hybridization Buffer (75 µl)
- Hybridization Buffer Enhancer (30 µl)
- 2x tampón de lavado con gránulos (1250 µl)



- 10x tampón de lavado de restricción (200 µl)
- 10x tampón de lavado I (160 µl)
- 10x tampón de lavado II (110 µl)
- 10x tampón de lavado III (110 µl)
- En función del formato del kit: 32, 48 o 96 adaptadores de indexado doble compatibles con Illumina® en formato de placa de 96 pocillos (7 µl cada uno): consulte el Anexo 1 para secuencias y visualización de los adaptadores.

BOX 2 (ALMACENAR ENTRE +2 Y +8 °C)

- Estreptavidina M-270 Dynabeads® (440 µl)
- Agencourt® AMPure® XP (3 uds. de 1,5 ml para 16 muestras, 8,7 ml para 32 muestras y 11,6 ml para 48 muestras; consulte la nota en el caso de 96 muestras)
- Tampón TE bajo IDTE (10 ml)
- Agua libre de nucleasas (20 ml)

Nota: En el caso de 96 muestras, se proporcionan dos BOX 2 de 48 muestras (consulte la tabla de la página anterior).



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

SOPHiA GENETICS™ DNA LIBRARY PREP KIT I (ALMACENAR ENTRE -25 Y -15 °C)

- Para 32 muestras, se proporcionan dos kits de 16 muestras.
- Para 96 muestras, se proporcionan dos kits de 48 muestras.

COMPONENTES	FORMATO DEL KIT	
	Kit de 16 muestras	Kit de 48 muestras
Mezcla maestra para PCR de alta fidelidad (en µl), 2 uds.	500	1560
Amplificación de bancos Illumina® con mezcla de cebador (en µl)	30	95
Mezcla de enzimas FX (en µl)	200	625
10x tampón FX (en µl)	100	315
Potenciador FX (en µl)	100	315
ADN ligasa (en µl)	200	625
5x tampón de ADN ligasa (en µl)	400	1250



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



4.1.2. Advertencias y precauciones

Nombre del producto	Pictogramas 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.	Peligro	Formamida Concentración: 100% CAS: 75-12-7



Nombre del producto	Pictogramas CLP	Declaraciones de peligro	Palabra de advertencia	Componente peligroso
		• 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. • 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	Peligro	Dodecilsulfato sódico Concentración: 4,9 % CAS: 151-21-3



Pictogramas		Declaraciones de peligro	Palabra de advertencia	Componente peligroso
Nombre del producto	CLP			
		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.		
5x tampón de ADN ligasa		- H335 Puede irritar las vías respiratorias. - P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.	Advertencia	polietilenglicol Concentración: 1-5% CAS: 9002-93-1

Utilice  y  como equipos de protección individual.

4.1.3. Material requerido (no suministrado)

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

- Kit de amplificación de bancos KAPA™ KK2620 (N.º de catálogo de Roche: N.º: 07958978001)
- 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 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 ADN
 - Termobloque o baño de agua (compatible con tubos de 1,5 ml)
 - 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)
 - Agitadora vorticial



4.2. Preparación de bancos

4.2.1. Preparación de ADN genómico

MATERIALES

- ADN genómico (ADNg) bicatenario de alta calidad
- Potenciador FX
- IDTE
- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa

IMPORTANTE

La integridad, concentración y pureza del ADN son cruciales durante este paso. La pureza del ADN se puede evaluar con un espectrofotómetro UV. La relación de absorbancia recomendada es de entre 1,8-2,0 para la relación 260/280 y de 1,6-2,4 para 260/230. Se recomienda confirmar la integridad de la muestra mediante electroforesis capilar o una técnica equivalente. Para evitar errores en el aporte de ADN, se recomienda utilizar una dilución inicial para obtener una concentración de rango 50 a 100 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.

PREPARACIÓN

Retire el potenciador FX del almacenamiento a -20 °C y deje que se descongele a temperatura ambiente. Después de su descongelación, mezcle el reactivo invirtiendo suavemente el tubo 5 veces y hágalo girar brevemente en una microcentrifugadora.

En función del formato del kit, el número de muestras de ADN que se debe mezclar por reacción de captura variará de acuerdo a la siguiente tabla. Se debe tener en cuenta antes de comenzar.

FORMATO DEL KIT	Kit de 16 muestras	Kit de 32 muestras	Kit de 48 muestras	Kit de 96 muestras*
Número de bancos individuales por captura	4	8	12	12

* Para 96 muestras, se proporcionan dos kits de 48 muestras, que incluyen 8 reacciones de captura.

PROCEDIMIENTO

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

NÚMERO DE REACCIONES	4	8	12	16	24	32	48
Tira de PCR	De 4 tubos	De 4 tubos	De 4 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos
Número de tiras	1	2	3	2	3	4	6



2. Prepare la dilución para cada muestra de ADN genómico (ADNg) de alta calidad en el número adecuado de tiras de PCR, de la siguiente manera:

DILUCIÓN de ADNg	
ADNg	200 ng
IDTE	Completo hasta 30 µl

- 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.

- En función del número de muestras, proceda de la siguiente manera:
 - Si se procesan **4 muestras**, añada 5 µl de potenciador FX en cada tubo de la tira de 4 tubos con 30 µl de muestras de ADNg (en total, 35 µl en cada tubo de la tira de 4 tubos).
 - Si se procesan **8 o más muestras**, proceda de la siguiente manera:
 - a. Para facilitar el pipeteo, cree un reservorio de potenciador FX añadiendo los siguientes volúmenes a un nuevo grupo de tiras de 4 u 8 tubos de acuerdo al siguiente esquema:

NÚMERO DE REACCIONES	8	12	16	24	32	48
Tira PCR (1 tira)	De 4 tubos	De 4 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos
Potenciador FX (en µl)	11,5	17,5	11,5	17,5	24	36

- b. Con una pipeta multicanal, añada 5 µl del potenciador FX de los tubos anteriores a 30 µl de muestras de ADNg (en total, 35 µl en cada tubo de las tiras de 4 u 8 tubos).
- Con una pipeta multicanal ajustada a 20 µl, mezcle suavemente pipeteando hacia arriba y hacia abajo 5 veces y hágalos girar brevemente en una microcentrifugadora.

3. Consérvelos en hielo hasta la preparación de la reacción de fragmentación enzimática.

4.2.2. Preparación de reactivos y premezclas

COMPONENTES Y REACTIVOS

- Mezcla de enzimas FX
- 10x tampón FX
- 5x tampón de ADN ligasa
- ADN ligasa
- Mezcla maestra para PCR de alta fidelidad, 2 uds.
- Amplificación de bancos Illumina® con mezcla de cebador
- Agua libre de nucleasas
- Gránulos AMPure® XP
- Etanol

PREPARACIÓN

- Extraiga los componentes del SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I del almacenamiento a -20 °C y descongélelos en hielo.



- Retire la Placa de adaptadores de indexado doble del almacenamiento a -20 °C e introdúzcala en un frigorífico a 4 °C para su uso posterior.
- Retire los gránulos AMPure® XP del almacenamiento a 2-8 °C y deje que se equilibren a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos.
- Prepare etanol puro al 80 % (volumen según el siguiente esquema en función del número de reacciones):

ETANOL 80 %							
Número de reacciones	4	8	12	16	24	32	48
Etanol 80 % (en ml)	10	20	30	30	40	50	70

- Una vez descongelados los componentes de SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I, mezcle los reactivos invirtiendo el tubo entre 5 y 10 veces y hágalo girar brevemente en una microcentrifugadora.

PREMEZCLAS

1. Prepare la **premezcla de reacción FX** de la siguiente forma:

PREMEZCLA DE REACCIÓN FX							
Número de reacciones	4	8	12	16	24	32	48
10x tampón FX (en µl)	23,6	47,1	75	95	150	190	300
Mezcla de enzimas FX (en µl)	47,1	94,2	150	190	300	380	600

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

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

PREMEZCLA DE UNIÓN							
Número de reacciones	4	8	12	16	24	32	48
5x tampón de unión de ADN (in µl)	95	190	300	380	600	760	1200
ADN ligasa (en µl)	47,5	95	150	190	300	380	600
Agua libre de nucleasas (en µl)	71,3	142,5	225	285	450	570	900

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





Importante: El tampón de unión de ADN es muy viscoso, pipetee suavemente y asegúrese de obtener una premezcla de unión homogénea.

3. Prepare la **premezcla de PCR** de la siguiente forma:

PREMEZCLA DE PCR							
Número de reacciones	4	8	12	16	24	32	48
Mezcla maestra para PCR de alta fidelidad (en µl), 2 uds.	115	230	345	460	690	920	1380
Amplificación de bancos Illumina® con mezcla de cebador (en µl)	6,9	13,8	20,7	27,6	41,4	55,2	82,8
Agua libre de nucleasas (en µl)	16,1	32,2	48,3	64,4	96,6	128,2	193,2

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

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

MATERIALES

- ADNg bicatenario acondicionado y diluido en 35 µl
- Premezcla de reacción FX
- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa

PREPARACIÓN

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

	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (MINUTOS)
Tapa	70	-
Paso 1	4	1
Paso 2	32	5
Paso 3	65	30
Espera	4	∞

- Inicie el programa de fragmentación FX. 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. En función del número de muestras, proceda de la siguiente manera:

- Si se procesan **4 muestras**, continúe con el paso 2.
- Si se procesan **8 o más muestras**, para facilitar el pipeteo, cree un reservorio de una premezcla de reacción FX añadiendo los siguientes volúmenes a un nuevo grupo de tiras de 4 u 8 tubos de acuerdo al siguiente esquema:

NÚMERO DE REACCIONES	8	12	16	24	32	48
Tira PCR (1 tira)	De 4 tubos	De 4 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos
Premezcla de reacción FX (en µl)	33	52,5	33	52,5	66	105

2. Componga la reacción de la siguiente forma:

- Con una pipeta multicanal si se procesan 8 o más muestras, añada 15 µl de la premezcla de reacción FX a 35 µl de muestras de ADNg (en total, 50 µl en tiras de 4 u 8 tubos).
- Con una pipeta ajustada a 40 µl (multicanal si se procesan 8 o más muestras), mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 5 veces y hágala girar brevemente en una microcentrifugadora.

3. Colóquelas en un termociclador y continúe con el programa de fragmentación FX.

Continúe de inmediato con la unión

4.2.4. Unión

MATERIALES

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

PREPARACIÓN

- Retire la placa de adaptadores de indexado doble a 4 °C (transferida anteriormente de -20 °C a 4 °C) y hágala girar brevemente para acumular todo el líquido. Consulte el Anexo 1 para ver el formato de placa correspondiente.



- Durante la fragmentación FX, prepare nuevas tiras de PCR con 5 µl de diferentes adaptadores de indexado doble por tubo según su estrategia de indexado, de acuerdo al siguiente esquema:

NÚMERO DE REACCIONES	4	8	12	16	24	32	48
Tira de PCR	De 4 tubos	De 4 tubos	De 4 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos
Número de tiras	1	2	3	2	3	4	6

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

PROCEDIMIENTO

- En función del número de muestras, proceda de la siguiente manera:
 - Si se procesan **4 muestras**, continúe con el paso 2.
 - Si se procesan **8 o más muestras**, 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	12	16	24	32	48
Tira PCR (1 tira)	De 4 tubos	De 4 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos
Premezcla de unión (en µl)	100	160	100	160	200	320

- Con una pipeta multicanal, transfiera 50 µl de cada producto de reacción de fragmentación FX a las tiras de 4 u 8 tubos que contienen 5 µl de adaptadores de indexado doble.
- Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces y haga girar brevemente.
- Con una pipeta multicanal si se procesan 8 o más muestras, añada 45 µl de la premezcla de unión a cada producto de reacción de fragmentación FX (55 µl en cada tubo de la tira de 4 u 8 tubos).
- Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces y haga girar brevemente.
- Deje incubar en el termociclador a 20 °C durante 15 minutos (con la tapa abierta).



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

Continúe con la purificación posterior a la unión.



4.2.5. 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
- Agua libre de nucleasas
- 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 hágalo girar brevemente para acumular todo el líquido.
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 105 µl de agua libre de nucleasas y espere unos segundos.
Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces. Deje incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y hágalo girar brevemente para acumular todo el líquido.
11. 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.
12. Con una pipeta multicanal, transfiera con cuidado 100 µl de sobrenadante a nuevas tiras de 4 u 8 tubos etiquetadas.

Continúe con la selección de tamaño doble.



4.2.6. Selección de tamaño doble

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 60 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 hágalo girar brevemente para acumular todo el líquido.
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. Con una pipeta multicanal, transfiera con cuidado 140 µl de sobrenadante a nuevas tiras de 4 u 8 tubos etiquetados que contienen 20 µl de gránulos AMPure XP. Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces.
5. Deje incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y hágalo girar brevemente para acumular todo el líquido.
6. Coloque las tiras de 4 u 8 tubos en un soporte magnético con formato de placa de 96 pocillos durante 3 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
7. Deseche con cuidado 150 µl de sobrenadante con una pipeta multicanal.

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

8. Con una pipeta multicanal, añada a los gránulos 170 µl de etanol al 80 %.
Deje reposar los tubos entre 30 segundos y 1 minuto.
9. Deseche con cuidado el etanol con una pipeta multicanal.
10. Repita una vez los pasos 8 y 9.
11. Retire el etanol remanente con una pipeta multicanal P10 o P20.
12. Deje secar al aire los gránulos a temperatura ambiente durante 4 minutos. No seque en exceso los gránulos porque podría disminuir la cantidad de ADN recuperado.

Retire los tubos del soporte magnético.

13. 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.



4.2.7. Amplificación de bancos

MATERIALES

- Productos de unión seleccionada de tamaño doble y gránulos resuspendidos en 20 µl de IDTE cada uno
- Premezcla de PCR

PREPARACIÓN

Programa 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

- En función del número de muestras, proceda de la siguiente manera:
 - Si se procesan **4 muestras**, continúe con el paso 2.
 - Si se procesan **8 o más muestras**, proceda de la siguiente manera:
 - Para facilitar el pipeteo, cree un reservorio de una premezcla de PCR añadiendo los siguientes volúmenes a un nuevo grupo de tiras de 4 u 8 tubos de acuerdo al siguiente esquema:

NÚMERO DE REACCIONES	8	12	16	24	32	48
Tira PCR (1 tira)	De 4 tubos	De 4 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos	De 8 tubos
Premezcla de PCR (en µl)	65	100	65	100	130	200

- Componga la reacción de la siguiente forma:



- Con una pipeta multicanal si se procesan 8 o más muestras, añada 30 µl de la premezcla de PCR a cada producto de unión seleccionada de tamaño doble y gránulos (volumen total: 50 µl = 30 µl + 20 µl).
 - Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces y haga 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.

4.2.8. 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 hágalo girar brevemente para acumular todo el líquido.
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 20 µl de agua libre de nucleasas. Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces. Déjelo incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y hágalo girar para acumular todo el líquido.
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 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.

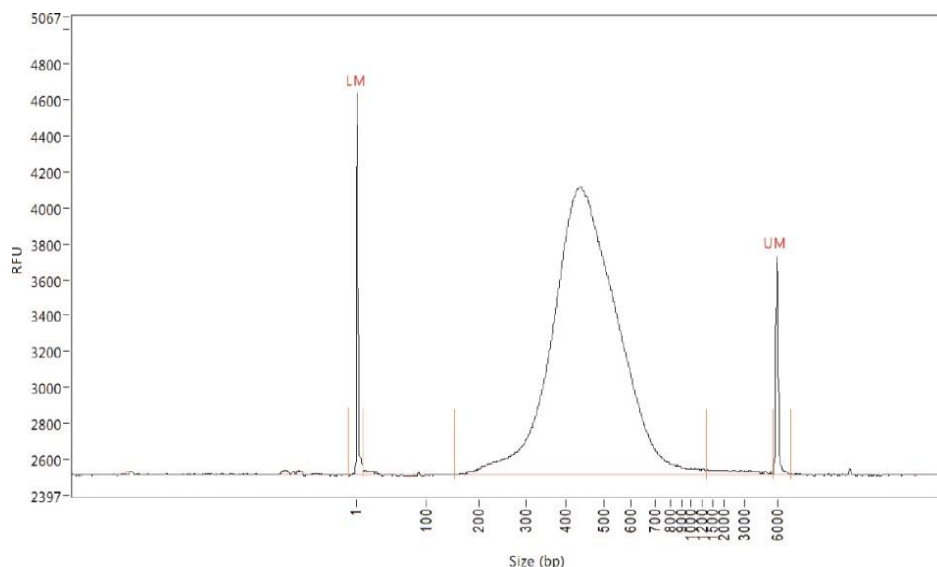
4.2.9. Cuantificación de bancos individual y control de calidad

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 300 bp y 700 bp.



Ejemplo de distribución de bancos de ADN obtenida con el sistema de electroforesis capilar de Analizador de fragmentos Agilent. UM: Upper Marker (Marcador superior), LM: Lower Marker (Marcador inferior)



4.3. Captura

4.3.1. Agrupamiento de bancos

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 (Consulte la tabla del punto 3)	1	2	3	4
Human Cot DNA (en µl)	5	11	16,5	22
Universal Blockers - TS Mix (en µl)	2	4,4	6,6	8,8

2. Al llevar a cabo dos o más capturas, pipetee 7 µl de la premezcla anterior en tubos de baja unión de ADN individuales.
3. Añada a los tubos individuales que contienen la premezcla anterior un grupo de bancos individuales de acuerdo al formato del kit:

FORMATO DEL KIT	Kit de 16 muestras	Kit de 32 muestras	Kit de 48 muestras	Kit de 96 muestras
Número de bancos individuales por captura	4	8	12	12
Cantidad de cada banco por captura	300 ng	200 ng	150 ng	150 ng
Cantidad total de bancos por captura	1200 ng	1600 ng	1800 ng	1800 ng

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.



4.3.2. Hibridación

MATERIALES

- Bancos liofilizados
- 2x tampón de hibridación
- Potenciador de tampones de hibridación
- Myeloid Solution probes
- Agua libre de nucleasas
- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa
- 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 3 y 5, 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 durante 4 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.

4.3.3. 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 de 4 horas.

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 hibrizadas a gránulos.

4.3.4. Unión de dianas hibrizadas a gránulos

MATERIALES

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

PROCEDIMIENTO



Importante: Trabaje rápido para garantizar que la temperatura de la muestra 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 incubar 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.



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

MATERIALES

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

PROCEDIMIENTO



Importante: Trabaje para garantizar 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, observe 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 vorticial 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 vorticial 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.



4.3.6. Amplificación post-captura

MATERIALES

- Suspensión de agua libre de nucleasas/de gránulos de estreptavidina (20 µl)
- 2x KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix
- Mezcla de cebador de amplificación de bancos, 10 uds.
- Agua libre de nucleasas

PREPARACIÓN

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

	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (SEGUNDOS)	
Tapa	99	-	15 ciclos
Paso 1: Desnaturalización inicial	98	45	
Paso 2: Desnaturalización	98	15	
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
2x KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix (en µl)	25	55	82,5	110
Mezcla de cebador de amplificación de bancos (en µl), 10 uds.	2,5	5,5	8,25	11
Agua libre de nucleasas (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 haga 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.

4.3.7. 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 para acumular todo el líquido.
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 el tubo o 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 el tubo o 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 acumular todo el líquido.
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.



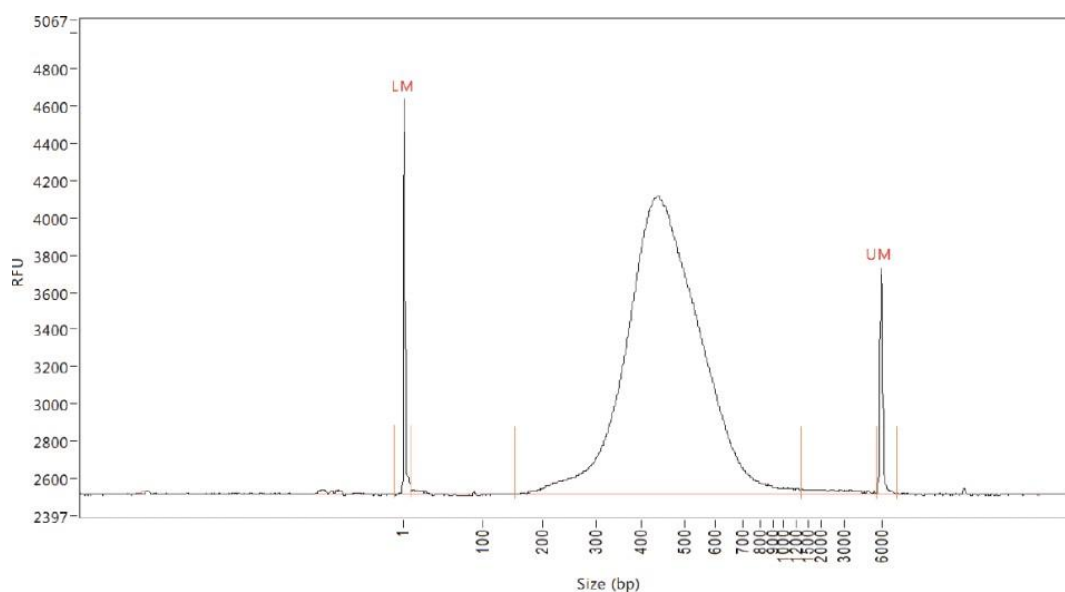
4.3.8. Cuantificación final de bancos y control de calidad

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 300 bp y 700 bp.



Ejemplo de distribución del tamaño del grupo de bancos capturados obtenida con el sistema de electroforesis capilar de Analizador de fragmentos Agilent. UM: Upper Marker (Marcador superior), LM: Lower Marker (Marcador inferior)



4.4. Secuenciación

4.4.1. Preparación de bancos para secuenciación

MATERIALES

- Kit de reactivos MiSeq® de Illumina v3
- Bancos finales capturados
- Tampón de elución modificado o similar

PROCEDIMIENTO

1. Determine la molaridad de cada grupo 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 a 4 nM y mézclelos en igual cantidad (p. ej., 5 μl de cada uno). Mezcle bien y utilice esta dilución de acuerdo a la recomendación de desnaturalización estándar de Illumina®.
3. Deposite una dilución de 10 pM de los bancos desnaturalizados en MiSeq®.
4. Las lecturas mínimas recomendadas son 2,0 millones de lecturas por muestras, con una longitud de lectura de 300 bp.

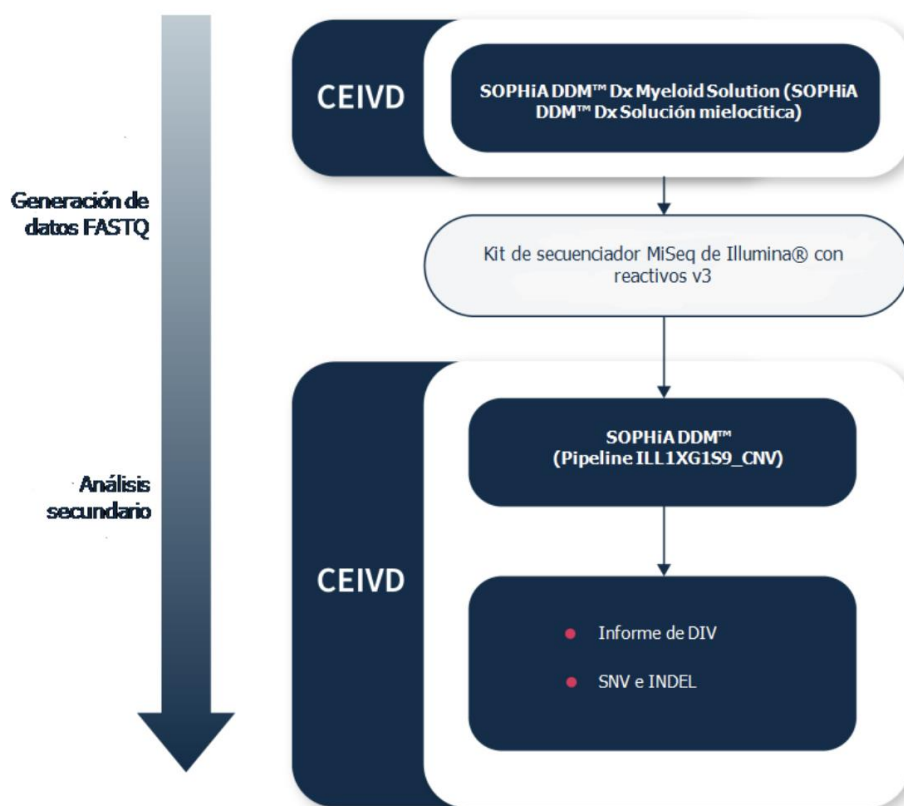


5. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

5.1. Instrucciones de instalación del modo SOPHiA DDM™ Dx

No se requiere ninguna instalación para utilizar el modo SOPHiA DDM™ Dx. Se facilitará un correo electrónico con instrucciones y un enlace al modo SOPHiA DDM™. Consulte el Manual del usuario del modo SOPHiA DDM™ Dx para obtener información sobre la gestión de la cuenta, compatibilidad con navegadores y otros avisos importantes. Los documentos de apoyo también están disponibles directamente a través del modo SOPHiA DDM™ Dx.

5.2. Descripción del flujo de trabajo de análisis para la generación de resultados de DIV



Descripción del flujo de trabajo de análisis para la SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution

Consulte el Manual del usuario del modo SOPHiA DDM™ Dx para obtener una descripción completa del flujo de trabajo de carga.



6. LIMITACIONES, ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

ADVERTENCIAS GENERALES

- Para obtener instrucciones detalladas sobre el software, consulte el Manual del usuario del modo SOPHiA DDM™ Dx.
- Si se modifica cualquier parte de la manipulación, el protocolo, el secuenciador, la multiplexación, etc., las Instrucciones de uso descritas no cubren el análisis.
- Los datos proporcionados en el informe de calidad (disponible para su descarga desde la plataforma SOPHiA DDM™) solo es informativo y no está destinado a su uso para diagnóstico.
- No se puede garantizar la exactitud de los resultados del análisis. Los laboratorios de secuenciación deben realizar comprobaciones de calidad de las muestras y marcar las muestras no aptas. Las muestras no aptas (p. ej., muestra de biopsia insuficiente) podrían derivar en resultados divergentes. SOPHiA GENETICS no se hace responsable de los resultados y decisiones consiguientes tomadas en base a estos resultados.
- Los estándares y procedimientos de buenas prácticas de laboratorio, además de seguir rigurosamente las IdU, se requieren para obtener una calidad adecuada del producto. Para obtener información específica sobre la seguridad, consulte las Fichas de datos de seguridad (FDS) correspondientes proporcionadas con cada componente del producto.
- Se deben definir áreas separadas físicamente de pre-PCR y post-PCR para evitar la contaminación de las muestras de ADN. Utilice siempre reactivos nuevos y ADN correctamente extraído y almacenado. Para obtener información sobre la calidad y la integridad del ADN, consulte la Sección 5. Materiales del kit y métodos - Sección 5.2.1 Preparación de ADN genómico de las IdU.
- 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.
- 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.

LIMITACIONES GENERALES

- Una mala calidad de los datos debido a problemas en la preparación de la muestra o en el paso de secuenciación puede entorpecer el análisis de los datos y provocar positivos falsos y/o negativos falsos.
- La ausencia de una variante en el informe no descarta la presencia de una variación por debajo de los límites de detección del ensayo.



PARA PROCEDIMIENTO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

SNV / INDEL

- Se ha optimizado la detección de variantes en este producto para la detección de SNV e INDEL cortas (hasta 2/3 de la longitud de lectura). Tenga en cuenta que el algoritmo puede pasar por alto cualquier otro tipo de alteración.
 1. No se pueden detectar inversiones ni fusiones de genes.
 2. Es posible que no se detecten las eliminaciones o inserciones con un valor crítico fuera de la región objetivo.
- Se ha optimizado la detección de variantes de este producto en las regiones definidas como «regiones objetivo». Tenga en cuenta que las regiones que no se abarquen en esta definición pueden presentar negativos falsos y/o positivos falsos.
- Para una calidad sólida del algoritmo, recomendamos una cobertura de al menos 1000x para satisfacer la relevancia estadística en comparación con el ruido para la mayoría de las posiciones. Una cobertura menor aumentará significativamente el riesgo de identificaciones de variantes negativas falsas.
- Es posible que se pasen por alto o se identifiquen erróneamente versiones debido a las limitaciones de diseño del kit.
- Las variantes en las regiones para las que el fragmento relevante de ADN no se extrae mediante sondas no pueden ser detectadas por el producto. Las variantes de captura pueden estar limitadas por:
 1. INDEL que afecten a la hibridación de sondas. Puede derivar en la falta de detección o en una estimación incorrecta de fracciones de variantes.
 2. La presencia de mutaciones adicionales en la región objetivo de la sonda en el mismo alelo.
- Las SNV o INDEL en homopolímeros con una longitud de diez pares de bases o superior no pueden denominarse como de confianza, dado que su detección se confunde por un alto ruido de fondo.
- Se pueden indicar las variantes de delección-inserción complejas como variantes múltiples en caso de representarse en la alineación como varias variantes más pequeñas que están separadas por más de 2 nucleótidos.
- También puede que falten las SNV o INDEL de regiones de repetición larga o baja complejidad especificadas en las regiones marcadas del Anexo 4.
- Las regiones marcadas en el Anexo 4 presentan características que representan una detección de variantes poco fiable. Se informa de ellas con advertencias en la interfaz de SOPHiA DDM™ y se indican con una marca las variantes detectadas en estas regiones.
- Las regiones con alta homología de secuencias pueden causar incertidumbre en el mapeo y el riesgo de omitir o identificar variantes erróneas.
- Las variantes pueden estar representadas de diferentes formas en una región determinada. Si una parte de las lecturas informa de la variante de otra forma o no captura la variante, es posible que se subestime la fracción de variantes o que la variante se pase por alto debido a una fracción de variantes baja.



- En el caso de que haya varias inserciones / duplicidades dentro de una misma región, es posible que no se informe de todas correctamente. En especial, cuando una inserción más pequeña está completamente contenida dentro de una inserción más grande, es posible que no haya lecturas que identifiquen de forma exclusiva la inserción más pequeña, que se pase por alto y solo se informe de la inserción más grande.
- En el caso de que existan múltiples inserciones / duplicidades dentro de una misma región, es posible que no se cuantifiquen todas correctamente. En especial, cuando una inserción más pequeña está completamente contenida dentro de una inserción más grande, es posible que no haya lecturas que identifiquen de forma exclusiva la inserción más pequeña y que la fracción de variantes comunicada para la inserción más pequeña esté infravalorada y la fracción de variantes de la inserción más grande sobrevalorada.
- La interferencia de muestras debido a un salto de índice puede verse agravada por los siguientes factores:
 1. Una cobertura muy alta de una o varias muestras debido a problemas durante la cuantificación/normalización de las muestras o amplificaciones de genes de alto grado
 2. Una sobrecarga de la cubeta de lectura, por ejemplo, gran densidad de clústeres
 3. Las diferencias en la tasa de conversión de bancos
- La interferencia de muestras en presencia de una baja contaminación del índice (<1 %) puede verse agravada por los siguientes factores:
 1. Una cobertura muy alta de una o varias muestras debido a problemas durante la cuantificación/normalización de las muestras o amplificaciones de genes de alto grado
 2. Una sobrecarga de la cubeta de lectura, por ejemplo, gran densidad de clústeres
 3. Las diferencias en la tasa de conversión de bancos
- Se recomienda que el usuario tenga precaución al interpretar las variantes notificadas por debajo del 2,5 % y, tal vez, que utilice otros métodos de ensayo alternativos para confirmarlo.
- Cualquier problema durante el procesamiento de SNG o problemas con la degradación de la muestra pueden provocar una baja relación señal-ruido y afectar negativamente a la identificación de variantes.
- Las alteraciones notificadas pueden incluir alteraciones somáticas (no heredadas) o de estirpes germinales (heredadas); sin embargo, el ensayo no distingue entre alteraciones somáticas y de estirpes germinales. El ensayo no ofrece información sobre la vulnerabilidad.



7. EVALUACIÓN DE CALIDAD PRECLÍNICA

7.1. MÉTODOS

General

En este estudio, se evaluó la calidad del kit SOPHiA DDM™ Dx MYS y del pipeline SOPHiA DDM™ Dx ILL1XG1S9_CNV con datos generados en un instrumento MiSeq® de Illumina mediante el ensayo SOPHiA DDM™ Dx MYS. El filtrado de variantes se configuró de acuerdo al ruido de fondo determinado en las muestras de dilución de estirpes germinales y las presentes declaraciones atañen a las variantes por encima del límite de detección determinado en nuestros experimentos.

Se excluyeron los homopolímeros de 10 bp, así como las regiones cubiertas por menos de 1000 lecturas. Para cada muestra, las variantes detectadas mediante pipeline se compararon con las variantes con el «criterio de referencia» confirmadas que proporcionó cada centro de secuenciación. No se consideró ninguna variante detectada fuera de las regiones objetivo (consulte el Anexo 4 para ver una lista completa de las regiones objetivo y las regiones marcadas). Una región, el exón 15 de JAK2 con un padding de 25 bp, tuvo una cobertura sistemáticamente inferior y, por tanto, se excluyó de nuestros análisis.

Definiciones de sensibilidad, especificidad, exactitud, precisión, repetibilidad y reproducibilidad

Se consideró cada posición analizada mediante el método de referencia y el método que combina el uso del instrumento MiSeq® y el panel SOPHiA DDM™ Dx MYS para calcular parámetros de calidad analítica como la sensibilidad, especificidad, exactitud, precisión y coherencia.

En el caso de todas las posiciones cubiertas por el panel SOPHiA DDM™ Dx MYS y para las que existía información de referencia, se determinaron los números de las siguientes categorías: los positivos verdaderos (PV, True Positives (TP)) y negativos verdaderos (NV, True Negatives (TN)) están presentes en ambos conjuntos; los positivos falsos (PF, False Positives (FP)) están presentes solo en las variantes detectadas por SOPHiA DDM™ Dx y los negativos falsos (NF, False Negatives (FN)) están presentes solo en la tabla de variantes confirmadas. Todas las posiciones cribadas (PV+PF+NV+NF (TP+FP+TN+FN)) se determinaron mediante la sustracción de posiciones sin determinar de la región objetivo del panel SOPHiA DDM™ Dx MYS, que cuenta con un CDS $\pm$ 25 bp de genes y exones especificados en la documentación de SOPHiA DDM™ Dx MYS:

- Regiones sin definir: las regiones que contienen variantes de baja confianza, o bien variantes confirmadas bajo el umbral fijado y, en el caso de la reproducibilidad y repetibilidad, las regiones con una profundidad de 1000 (para evaluar la reproducibilidad y repetibilidad de cobertura)
- Exón 15 de JAK2, que se ha identificado como una región en la que la cobertura es difícil
- Regiones conocidas con artefactos (regiones marcadas)
- Regiones sin datos de referencia disponibles o con datos ambiguos (consulte también la sección 5.1.3). Por ejemplo, la secuenciación de Sanger no puede informar de INDEL grandes en FLT3, por tanto, estas variantes se excluyeron.

Además, las INDEL localizadas en regiones de homopolímeros de 10 bp como mínimo se excluyeron de los cálculos.



Todos los parámetros se calcularon con las siguientes fórmulas:

1. La **sensibilidad** se determinó como el porcentaje de variantes confirmadas detectadas:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{TP}{TP+FN} \times 100$$

2. La **especificidad** se determinó como el porcentaje de posiciones negativas identificadas correctamente como negativas:

$$\text{Especificidad} = \frac{TN}{TN+FP} \times 100$$

(con NV (TN) = todas las posiciones cribadas-PV-PF-NF (TP-FP-FN))

3. La **exactitud** se determinó como el porcentaje de identificaciones correctas (positivas y negativas):

$$\text{Exactitud} = \frac{TP+TN}{TP+FP+TN+FN} \times 100$$

4. La **precisión** se determinó como el porcentaje de identificaciones positivas correctas de todas las identificaciones positivas:

$$\text{Precisión} = \frac{TP}{TP+FP} \times 100$$

5. La **repetibilidad de secuenciación** se determinó, para cada par de réplicas intraserales A y B, como el porcentaje de bases bien definidas (SP) en ambas muestras entre las bases que estaban bien definidas al menos en una muestra. Las bases se consideran bien definidas si cuentan con suficiente cobertura y no contienen identificaciones de variantes de baja confianza.

$$\text{Repetibilidad de secuenciación} = \frac{\sum_{i \in [SP_A \cap SP_B]} 1}{\sum_{i \in [SP_A \cup SP_B]} 1}$$

6. En la **repetibilidad de variantes** se tienen en cuenta todas las posiciones bien definidas en ambas réplicas para calcular la fracción de bases que son idénticas en ambas réplicas. Dadas las réplicas intraserales A y B con posiciones bien definidas SPA y SPB, SPA[i] y SPB[i] son el estado de la variante en la posición i., siendo dx el operador que devuelve 1 si x=0 y 0 si x'0, la repetibilidad de variantes se define como:

$$\text{Repetibilidad de variantes} = \frac{\sum_{i \in [SP_A \cap SP_B]} \delta_{SPA[i]-SPB[i]}}{\sum_{i \in [SP_A \cap SP_B]} 1}$$

7. La **repetibilidad** se define como el producto de los dos análisis anteriores:

$$\text{Repetibilidad} = \text{Repetibilidad de variantes} \times \text{Repetibilidad de secuenciación} \times 100$$

8. La **reproducibilidad** se define de forma equivalente a la repetibilidad (consulte las fórmulas (5)-(7)) de las réplicas intraserales A y B.



PV, PF, NV y NF (TP, FP, TN, FN) se calcularon sumando todas las muestras de cada ejecución. La sensibilidad, especificidad, exactitud y precisión se calcularon en base a dichos recuentos totales según las fórmulas indicadas anteriormente. La especificidad, exactitud y precisión solo se calcularon mediante muestras totalmente caracterizadas debido a la falta de posiciones negativas verdaderas en las muestras caracterizadas parcialmente. La repetibilidad y reproducibilidad se calcularon con todas las posiciones de todas las muestras y todas las ejecuciones consideradas.

Para determinar los intervalos de confianza en el caso de una sensibilidad del 100 % u otras determinaciones, se utilizaron los métodos descritos por Mattocks et al (2010) (Mattocks CJ et al, EuroGentest Validation Group, 2010). En los casos en los cuales los criterios determinados fueron inferiores al 100 %, se utilizó el método exacto (Clopper, et al 1934) para obtener el intervalo de confianza en la probabilidad binomial de sensibilidad, especificidad, exactitud y precisión (Clopper C et al, Biometrika, 1934). Para reflejar la diversidad verdadera de las variantes, solo se utilizaron los PV, PF, NF y NV (TP, FP, FN, TN) en los cálculos de intervalo de confianza.

7.2. DATOS

Las muestras disponibles se agrupan en dos categorías en función de la caracterización de alta confianza disponible para todas las comparaciones de referencia. Primero, SOPHiA GENETICS (Centro A (Site A)) o colaboradores externos (Centros B a E (Sites B-E)) procesaron muestras parcialmente caracterizadas con variantes de alta confianza identificadas en condiciones experimentales recomendadas.

Estos resultados contienen un gran conjunto de casos clínicos representativos y permiten estimar la sensibilidad de identificación de variantes. Además, se incluyeron réplicas para estimar la repetibilidad y la reproducibilidad. La segunda categoría de muestras constaba de muestras de referencia con regiones de alta confianza suministradas por el proveedor o variantes de alta confianza de Genome in a Bottle (GIAB), y de muestras clínicas con grandes porciones de regiones objetivo de SOPHiA DDM™ Dx MYS analizadas mediante secuenciación de Sanger u otros métodos de alta precisión (teniendo en cuenta los límites de detección de los respectivos métodos). Este conjunto de muestras bien caracterizadas permite la determinación de la especificidad, precisión y exactitud, además de la sensibilidad. Los datos de entrada provienen de varias ejecuciones multipaciente (un archivo de secuencia por paciente) ejecutados por cinco centros distintos de secuenciación: centros A-E. Todos los archivos de una ejecución se analizaron en conjunto como parte del mismo proceso por lotes.

7.3. CONCLUSIONES GENERALES

La siguiente tabla recopila los resúmenes completos de las variantes detectadas comparadas con la lista de variantes confirmadas (PV/NF (TP/FN)) para cada ejecución que contiene muestras caracterizadas parcialmente.

Tabla 2. Resúmenes de variantes de cada ejecución de muestras caracterizadas parcialmente

Ejecución	N.º de muestras	PV (TP)	NF (FN)
SiteA_Run01	1	15	0
SiteA_Run02	15	36	0
SiteA_Run03	16	37	0
SiteA_Run04	1	2	0
SiteA_Run06	1	15	0
SiteA_Run07	21	31	0
SiteA_Run08	20	142	0



Ejecución	N.º de muestras	PV (TP)	NF (FN)
SiteA_Run09	20	142	0
SiteA_Run10	24	599	0
SiteA_Run11	10	15	0
SiteA_Run14	8	8	0
SiteA_Run15	14	14	0
SiteB_Run01	22	78	0
SiteB_Run02	18	55	1
SiteC_Run01	11	57	0
SiteC_Run02	10	40	0
SiteD_Run01	10	15	0
SiteE_Run01	15	31	0
Total	237	1332	1

La siguiente tabla recopila los resúmenes completos de variantes detectadas comparadas con la lista de variantes confirmadas (PV/NF/PF (TP/FN/FP)) y las posiciones base sin variantes (NV (TN)) para cada ejecución de muestras totalmente caracterizadas.

Tabla 3. Resúmenes de variantes de cada ejecución de muestras totalmente caracterizadas

Ejecución	N.º de muestras	PV (TP)	NF (FN)	PF (FP)	NV (TN)
SiteA_Run08	18	132	0	0	469693
SiteA_Run09	18	132	0	0	469231
Otra	11	152	0	2	480194
Total	47	416	0	2	1419118

La siguiente tabla muestra las posiciones base de NV (TN) únicas y las variantes detectadas en este estudio de evaluación de la calidad. El número total de posiciones base en las regiones analizadas fue de 48 093 bases. Se detectaron doscientas diecinueve (219) variantes confirmadas únicas en el estudio. Los negativos verdaderos únicos que disponían de datos de referencia de alta confianza y cubrían un total de 48 092 bp, que abarcaba un 99 % de las regiones objetivo menos el exón JAK2 excluido (48 547 bp).

Tabla 4. Resúmenes de variantes de todas las ejecuciones

PV (TP)	219
PF (FP)	2
NF (FN)	1
NV (TN)	48092



7.4. RESULTADOS

La combinación del instrumento HiSeq™ o MiSeq® de Illumina, el ensayo SOPHiA DDM™ Dx MYS y SOPHiA DDM™ Dx deriva en una calidad observada de 99,92 % de sensibilidad, 99,99 % de especificidad, 99,99 % de exactitud, 99,52 % de precisión, 98,69 % de repetibilidad y 99,30 % de reproducibilidad.

Tabla 5. Resumen de la calidad

N.º	Evaluación de la calidad	Media	Percentil 5
A	Tasa específica	87,41 %	[59,59 %]
B	Uniformidad	99,88 %	[99,40 %]
C	Límite de detección	2,5 %* (observado)	[1 %]

N.º	Evaluación de la calidad	Observado	[IC inferior de 95 %]**
1	Sensibilidad	99,92 %	[97,49 %]
2	Especificidad	99,99%	[99,98%]
3	Exactitud	99,99%	[99,98%]
4	Precisión	99,52 %	[91,47 %]

N.º	Evaluación de la calidad	Observado	[IC inferior de 95 %]***
5	Repetibilidad	98,69 %	[98,66 %]
6	Reproducibilidad	99,30 %	[99,27 %]

* Para SNV e INDEL; FLT3-ITD esperada.

** Se calculó un IC del 95 % en las variantes únicas del estudio de evaluación de la calidad a fin de reflejar la diversidad real de las variantes.

*** Se calculó un IC del 95 % en todas las posiciones de todas las muestras. La repetibilidad y la reproducibilidad se basan en las comparaciones descritas en la equivalencia de selección de tamaño doble y la reproducibilidad entre centros.



8. 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
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Contiene suficiente para <n> ensayos
	Importador
	Fecha de fabricación
	Consulte Advertencias y precauciones en la «Sección 5. Materiales del kit y métodos»
	Consulte Advertencias y precauciones en la «Sección 5. Materiales del kit y métodos»



9. ASISTENCIA

En caso de dificultad a la hora de utilizar el modo SOPHiA DDM™ Dx, consulte la sección de resolución de problemas del Manual del usuario del modo SOPHiA DDM™ Dx disponible en el modo SOPHiA DDM™ Dx 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 del modo SOPHiA DDM™ Dx.

ANEXO 1. PLACAS DE ADAPTADORES DE INDEXADO DOBLE

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

	1	2	3	4	5	6	7	...	12
A	701-501	701-502	701-503	701-504					
B	702-501	702-502	702-503	702-504					
C	703-501	703-502	703-503	703-504					
D	704-501	704-502	704-503	704-504					
E	705-501	705-502	705-503	705-504					
F	706-501	706-502	706-503	706-504					
G	707-501	707-502	707-503	707-504					
H	708-501	708-502	708-503	708-504					



48 adaptadores de indexado doble compatibles con Illumina® en formato de placa de 96 pocillos (7 µl cada uno)

	1	2	3	4	5	6	7	...	12
A	701-501	703-502	705-503	707-501	709-502	711-503			
B	702-501	704-502	706-503	708-501	710-502	712-503			
C	703-501	705-502	701-504	709-501	711-502	707-504			
D	704-501	706-502	702-504	710-501	712-502	708-504			
E	705-501	701-503	703-504	711-501	707-503	709-504			
F	706-501	702-503	704-504	712-501	708-503	710-504			
G	701-502	703-503	705-504	707-502	709-503	711-504			
H	702-502	704-503	706-504	708-502	710-503	712-504			

96 adaptadores de indexado doble compatibles con Illumina® en formato de placa de 96 pocillos (7 µl cada uno)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	701-501	702-501	703-501	704-501	705-501	706-501	707-501	708-501	709-501	710-501	711-501	712-501
B	701-502	702-502	703-502	704-502	705-502	706-502	707-502	708-502	709-502	710-502	711-502	712-502
C	701-503	702-503	703-503	704-503	705-503	706-503	707-503	708-503	709-503	710-503	711-503	712-503
D	701-504	702-504	703-504	704-504	705-504	706-504	707-504	708-504	709-504	710-504	711-504	712-504
E	701-505	702-505	703-505	704-505	705-505	706-505	707-505	708-505	709-505	710-505	711-505	712-505
F	701-506	702-506	703-506	704-506	705-506	706-506	707-506	708-506	709-506	710-506	711-506	712-506
G	701-507	702-507	703-507	704-507	705-507	706-507	707-507	708-507	709-507	710-507	711-507	712-507
H	701-508	702-508	703-508	704-508	705-508	706-508	707-508	708-508	709-508	710-508	711-508	712-508



i5	Secuencias i5 de hoja de muestras
D501	TATAGCCT
D502	ATAGAGGC
D503	CCTATCCT
D504	GGCTCTGA
D505	AGGCGAAG
D506	TAATCTTA
D507	CAGGACGT
D508	GTACTGAC

i7	Secuencias i7 de hoja de muestras
D701	ATTACTCG
D702	TCCGGAGA
D703	CGCTCATT
D704	GAGATTCC
D705	ATTCAGAA
D706	GAATTCGT
D707	CTGAAGCT
D708	TAATGCGC
D709	CGGCTATG
D710	TCCGCGAA
D711	TCTCGCGC
D712	AGCGATAG



ANEXO 2. EQUIPOS DE LABORATORIO UTILIZADOS EN EL LABORATORIO DE SOPHIA GENETICS

MATERIALES SUMINISTRADOS POR EL USUARIO	PROVEEDOR	NOMBRE DE PRODUCTO	N.º DE CATÁLOGO
Tiras de 8 tubos sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa (0,2 ml)	Thermo Fisher Scientific	Tubos con tapa a presión EasyStrip	AB-2000
Tubos de baja unión de ADN (1,5 ml)	Axygen	Tubos de microcentrífuga MaxyClear	MCT-175-C
Tubos (1,5 ml)	Eppendorf	Tubos Eppendorf	3810X
Tubos cónicos (15 ml y 50 ml)	Falcon	Tubos cónicos de centrífuga de 15 ml y 50 ml	352096 y 352070
Puntas con filtro	Starlab	TipOne RPT	S1180-3710, S1183- 1740, S1180-8710, S1180-9710, S1182- 1730
Etanol (grado de biología molecular)	Merck	Etanol puro	1.00983.1000

ÁREA PRE-PCR	PROVEEDOR	NOMBRE DE PRODUCTO	N.º DE CATÁLOGO
Agitadora vorticial	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Microcentrifugadora de mesa (compatible con tiras de 8 tubos)	Starlab	Minicentrifugadora	N2631-0007
Soporte de separador magnético de 96 pocillos	Alpaqua	Placa magnética 96S Super	A001322
Soporte de separador magnético de 96 pocillos	Thermo Fisher Scientific	Imán lateral 96 DynaMag	12331D
Pipetas multicanal (P10; P100; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108- 1100, S7108-3300
Termociclador con tapa calefactora programable	Biometra	TAdvanced 96	

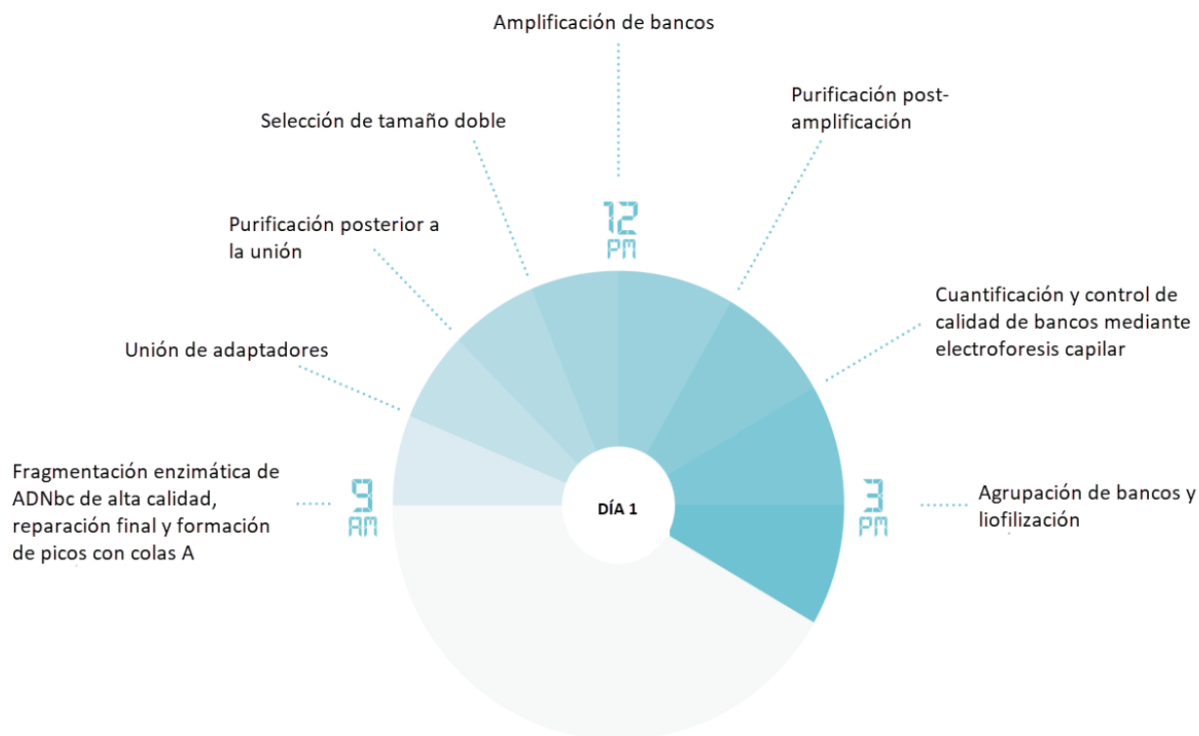


ÁREA PRE-PCR	PROVEEDOR	NOMBRE DE PRODUCTO	N.º DE CATÁLOGO
Equipo y reactivo para determinación cuantitativa fluorométrica	Thermo Fisher Scientific	Kit de ensayo de ADNbc HS Qubit y fluorímetro Qubit 3.0	Q33216 y Q32854
Pipetas monocal (P10; P100; P200; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100- 1100, S7100-2200, S7100-1000

ÁREA POST-PCR	PROVEEDOR	NOMBRE DE PRODUCTO	N.º DE CATÁLOGO
Termociclador con tapa calefactora programable	Biometra	TAdvanced 96	
Sistema de electroforesis capilar	Advanced Analytical	Analizador de fragmentos Agilent	
Concentrador de vacío (SpeedVac™ o similar)	Thermo Fisher Scientific	Savant DNA120-230	
Termobloque seco o baño de agua (compatible con tubos de 1,5 ml)	Techne	Dri-Block DB-1	
Soporte de separador magnético (compatible con tubos de 1,5 ml)	Thermo Fisher Scientific	Soporte de separador MagJET, 12 tubos de 1,5 ml	MR02
Soporte de separador magnético (de 96 pocillos)	Alpaqua	Placa magnética 96S Super	A001322
Soporte de separador magnético de 96 pocillos	Thermo Fisher Scientific	Imán lateral 96 DynaMag	12331D
Agitadora vorticial	Grant instrument	Agitadora vorticial multitubo, V32	
Agitadora vorticial	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Microcentrifugadora de mesa (compatible con tiras de 8 tubos)	StarLab	Minicentrifugadora	N2631-0007
Pipetas multicanal (P10; P100; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108- 1100, S7108-3300
Equipo y reactivo para determinación cuantitativa fluorométrica	Thermo Fisher Scientific	Kit de ensayo de ADNbc HS Qubit y fluorímetro Qubit 3.0	Q33216 y Q32854
Pipetas monocal (P10; P100; P200; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100- 1100, S7100-2200, S7100-1000

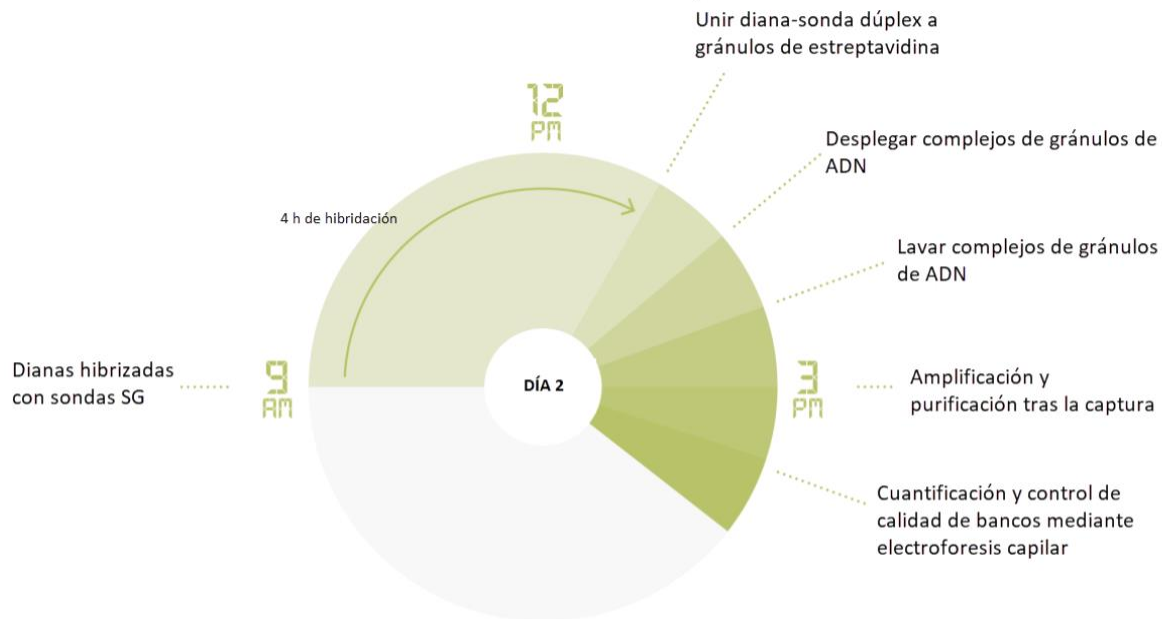


ANEXO 3. FLUJO DE TRABAJO GENERAL: SOLUCIONES DE CAPTURA SOPHIA DDM™





Preparación de bancos Con SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I



CAPTURA

FLUJO DE TRABAJO SENCILLO

- SOLO 1-4 TUBOS A MANIPULAR (BANCOS AGRUPADOS MÚLTIPLES)
- SOLO 3 HORAS DE TRABAJO PRÁCTICO



ANEXO 4. LISTA DE REGIONES OBJETIVO Y REGIONES MARCADAS APLICABLES

REGIONES OBJETIVO*

CROMOSOMA	INICIO	FIN
1	36931671	36931826
1	36931932	36932534
1	36932805	36932937
1	36933133	36933277
1	36933397	36933588
1	36933650	36933847
1	36934731	36934883
1	36935227	36935466
1	36937008	36937272
1	36937641	36937765
1	36937813	36938017
1	36938092	36938312
1	36939010	36939248
1	36939339	36939513
1	36940952	36941299
1	36945008	36945122
1	43814908	43815055
1	115256395	115256624
1	115258645	115258806
2	25457122	25457314
2	25458550	25458719
2	25459779	25459899
2	25461973	25462109
2	25463145	25463344
2	25463483	25463624
2	25464405	25464601
2	25466741	25466876



CROMOSOMA	INICIO	FIN
2	25466998	25467232
2	25467383	25467546
2	25468096	25468226
2	25468863	25468958
2	25469003	25469203
2	25469463	25469670
2	25469894	25470052
2	25470434	25470643
2	25470880	25471146
2	25472500	25472618
2	25475037	25475091
2	25497784	25497981
2	25498343	25498437
2	25505231	25505605
2	25522982	25523137
2	25536756	25536878
2	198266440	198266637
2	198266683	198266879
2	198267254	198267575
2	198267647	198267784
2	198268283	198268513
2	198269774	198269926
2	198269973	198270221
2	209113067	209113409
4	55561652	55561972
4	55589724	55589889
4	55591997	55592241
4	55593358	55593515
4	55593556	55593733
4	55594151	55594312
4	55599210	55599383
4	55602638	55602800



CROMOSOMA	INICIO	FIN
4	106155074	106158622
4	106162470	106162611
4	106163965	106164109
4	106164701	106164960
4	106180750	106180951
4	106182890	106183030
4	106190741	106190929
4	106193695	106194100
4	106196179	106197701
5	170834678	170834803
5	170837505	170837594
7	140453049	140453218
7	148504712	148504823
7	148506137	148506272
7	148506376	148506507
7	148507399	148507531
7	148508691	148508837
7	148511025	148511254
7	148511980	148512156
7	148512572	148512663
7	148513750	148513895
7	148514288	148514508
7	148514943	148515234
7	148516662	148516804
7	148523520	148523749
7	148524230	148524383
7	148525806	148525997
7	148526794	148526965
7	148529700	148529867
7	148543536	148543715
7	148544248	148544415
9	5021962	5022238



CROMOSOMA	INICIO	FIN
9	5029757	5029931
9	5044377	5044545
9	5050660	5050856
9	5054537	5054909
9	5055643	5055813
9	5064857	5065065
9	5066652	5066814
9	5068996	5069233
9	5069899	5070077
9	5072466	5072651
9	5073672	5073810
9	5077427	5077605
9	5078280	5078469
9	5080203	5080405
9	5080507	5080708
9	5081699	5081886
9	5089648	5089888
9	5090420	5090595
9	5090713	5090936
9	5122978	5123146
9	5126307	5126471
9	5126658	5126816
9	133738124	133738447
9	133747490	133747625
9	133748221	133748449
9	133750229	133750464
9	133753776	133753979
9	133755429	133755569
11	533740	533969
11	534186	534347
11	32410578	32410750
11	32413492	32413635



CROMOSOMA	INICIO	FIN
11	32414186	32414326
11	32417777	32417978
11	32421468	32421615
11	119148850	119149032
11	119149194	119149448
12	11803036	11803119
12	11905358	11905538
12	11992048	11992263
12	12006335	12006520
12	12022332	12022928
12	12037353	12037546
12	12038834	12038985
12	12043849	12044005
12	25380142	25380371
12	25398182	25398343
12	112888096	112888341
12	112910722	112910869
12	112915429	112915559
12	112915635	112915844
12	112919852	112920034
12	112924253	112924458
12	112926221	112926339
12	112926802	112927004
13	28592578	28592751
13	28607998	28608153
13	28608193	28608376
13	28608412	28608569
15	90631793	90632004
17	7572901	7573033
17	7573901	7574058
17	7576511	7576682
17	7576827	7576951



CROMOSOMA	INICIO	FIN
17	7576993	7577180
17	7577473	7577633
17	7578151	7578314
17	7578345	7578579
17	7579286	7579615
17	7579674	7579746
17	7579813	7579937
17	74732855	74733267
18	42529820	42533330
19	13054501	13054752
19	33792218	33793345
20	31019360	31019507
20	31021061	31021745
20	31022209	31025166
21	36164406	36164932
21	36171572	36171784
21	36193939	36194018
21	36206681	36206923
21	36231745	36231900
21	36252828	36253035
21	36259114	36259434
21	36265196	36265285
21	36421113	36421221
21	44514739	44514923
21	44524399	44524537
X	15808593	15808684
X	15809031	15809161
X	15817969	15818101
X	15821785	15821944
X	15822208	15822345
X	15826330	15826419
X	15827297	15827466



CROMOSOMA	INICIO	FIN
X	15833774	15834038
X	15836684	15836790
X	15838304	15838464
X	15840828	15841390

*Una región objetivo es la posición en la que el pipeline informará de variantes de alta confianza cuando estén presentes. Las coordenadas se basan en 1 y la coordenada final se incluye en la región.

REGIONES MARCADAS APLICABLES**

CROMOSOMA	INICIO	FIN	DESCRIPCIÓN	GEN_EXÓN
1	36933564	36933584	Los artefactos de secuenciación pueden confundir las variantes de esta región con una fracción de variantes inferior a un 10 % si se utiliza la química de Illumina® V2.	CSFR3_ ex14
17	7572977	7573010	Los artefactos de secuenciación pueden confundir las variantes de esta región con una fracción de variantes inferior a un 10 % si se utiliza la química de Illumina® V2.	TP53_ ex11
18	42533111	42533125	Los artefactos de secuenciación pueden confundir las variantes de esta región con una fracción de variantes inferior a un 10 % si se utiliza la química de Illumina® V2.	SETBP1_ ex04
21	36206686	36206787	Los artefactos de secuenciación pueden confundir las variantes de esta región con una fracción de variantes inferior a un 10 % si se utiliza la química de Illumina® V2.	RUNX1_ ex07
2	198267762	198267783	Los artefactos experimentales pueden confundir las variantes de esta región con una fracción de variantes inferior a un 10 %.	SF3B1_ ex13
5	170837510	170837526	Los artefactos experimentales pueden confundir las variantes de esta región con una fracción de variantes inferior a un 10 %.	NPM1_ ex11
9	5126453	5126462	Los artefactos de secuenciación pueden confundir las variantes de esta región con una fracción de variantes inferior a un 10 % si se utiliza la química de Illumina® V2.	JAK2_ ex24
11	119149355	119149373	Los artefactos de secuenciación pueden confundir las variantes de esta región con una fracción de	CBL_ ex09



CROMOSOMA	INICIO	FIN	DESCRIPCIÓN	GEN_EXÓN
			variantes inferior a un 10 % si se utiliza la química de Illumina® V2.	
19	33792754	33792775	Los artefactos de secuenciación pueden confundir las variantes de esta región con una fracción de variantes inferior a un 10 % si se utiliza la química de Illumina® V2.	CEBPA_ ex01
19	33793007	33793041	Los artefactos de secuenciación pueden confundir las variantes de esta región con una fracción de variantes inferior a un 10 % si se utiliza la química de Illumina® V2.	CEBPA_ ex01
20	31022441	31022449	Los artefactos de secuenciación pueden confundir las variantes de esta región con una fracción de variantes inferior a un 10 % si se utiliza la química de Illumina® V2.	ASXL1_ ex12
7	148543693	148543705	Los artefactos experimentales pueden confundir las variantes de esta región con una fracción de variantes inferior a un 10 %.	EZH2_ ex41
17	74733013	74733013	Los artefactos experimentales pueden confundir las variantes de esta región con una fracción de variantes inferior a un 10 %.	SRSF2_ ex1
20	31022262	31022262	Los artefactos experimentales que causan lecturas quiméricas pueden confundir las variantes de esta región con una fracción de variantes inferior a un 10 %.	ASXL1_ ex12
18	42531410	42531410	Los artefactos experimentales que causan lecturas quiméricas pueden confundir las variantes de esta región con una fracción de variantes inferior a un 10 %.	SETBP1_ ex04
12	112919878	112920009	Esta región es altamente homóloga.	PTPN11_ ex10

**Una región marcada es una determinada región que se superpone a un exón y podría causar cierta incertidumbre en la identificación de variantes, por ejemplo, baja complejidad, ruido, pseudogenes, etc. Podría depender de la tecnología de secuenciación. Una variante detectada en esta región no se clasificará como de baja confianza en SOPHiA DDM™ Dx, pero se asociará con un triángulo de advertencia y se puede encontrar un mensaje de advertencia detallado en la pestaña de advertencias. La columna de filtro de la variante correspondiente en la tabla final de todas las variantes no se marcará debido a esta región. Las coordenadas se basan en 1 y la coordenada final se incluye en la región.



Document Approvals
Approved Date: 28 Jan 2026

Approval Verdict: Approve	Coleman Spence, (cspence@sophiagenetics.com) Regulatory Approval 28-Jan-2026 01:10:06 GMT+0000
QA Approval Verdict: Approve	Claire Mullane, (cmullane@sophiagenetics.com) Quality Assurance Approval 28-Jan-2026 08:19:24 GMT+0000