

INSTRUCCIONES DE USO

16, 32, 48 Y 96 MUESTRAS

SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution



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





INFORMACIÓN DE RESUMEN

Nombre de producto	SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution
Tipo de producto	Solución en paquete
Familia de productos	Aplicación de diagnóstico molecular (kit + análisis)
ID del algoritmo	ILL1XG1G6_CNV
ID del panel de genes	HCS v1.1
Versión del producto	1.1
Tipo de muestra	ADN de estirpe germinal aislado de sangre periférica
Secuenciador	Illumina - MiSeq
Descripción de la GMDN	Software de interpretación de kit de reactivos de análisis del genoma humano/DIV
ID del documento	SG-00673
Versión del documento	v9.0
Fecha de modificación	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



BS0102ILLCGLL01-016
BS0102ILLCGLL01-032
BS0102ILLCGLL01-048
BS0102ILLCGLL01-096



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	BS0102ILLCGLL01-016	B1.01.0002.C-16	B2.0001.C-16	700232
	BS0102ILLCGLL01-032	B1.01.0002.C-32	B2.0001.C-32	700232
	BS0102ILLCGLL01-048	B1.01.0002.C-48	B2.0001.C-48	700234
	BS0102ILLCGLL01-096	B1.01.0002.C-96	B2.0001.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/V ERSIÓN	FECHA	Versión de las Instrucciones de Uso equivalente en inglés	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO
SG-00673 – 9.0	23 de mayo de 2025	SG-00658 - 11.0	- Cambio en el sistema de numeración de versiones, sin versiones adicionales entre la versión 8.4 y la versión 9.0. - 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: La declaración general de los principios y el procedimiento del ensayo ahora incluye Resumen y explicación del ensayo. - Sección 4: Eliminación de la descripción de los componentes que no son para DIV del ámbito de aplicación del dispositivo. - Advertencias y precauciones: Adición de la identificación CAS y la concentración de cada componente peligroso incluido en la lista. - Sección 6: Eliminación de las instrucciones sobre el análisis con la aplicación de escritorio SOPHiA DDM. - Sección 7: Eliminación de limitaciones fuera de alcance. - Sección 7: Adición de una limitación relativa al salto de índice. «Aplicación web SOPHiA DDM™» se ha cambiado a «modo SOPHiA DDM™ Dx» - Reformulaciones menores relacionadas con el cambio anterior - 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) - Se ha eliminado la propiedad intelectual de terceros proveedores de las secciones 5.1.1 Contenido del kit, 5.3.1 Agrupamiento de bancos y 5.3.2 Hibridación - Actualización del nombre del componente de preparación de librerías a SOPHiA GENETICS Library Prep Kit I. - Se agregó una nueva columna en la tabla de historial de revisiones para rastrear la versión correspondiente en inglés; la columna está vacía para todas las revisiones anteriores.
SG-00673 - 8.4	24 de septiembre de 2025		Actualización de la dirección de EC REP
SG-00673 - 8.3	23 de mayo de 2025		- Anexo 1: Se eliminó la tabla “16 adaptadores de indexado doble compatibles con Illumina® en formato de placa de 96 pocillos (7 µl cada uno)” del Anexo 1 debido a la discontinuación del formato de dicha placa. - Sección 5.1.1 Contenido del kit – ENVASE 1: Actualizada para reflejar el cambio anterior



ID DEL DOCUMENTO/V ERSIÓN	FECHA	Versión de las Instrucciones de Uso equivalente en inglés	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO
SG-00673 - 8.2	19 de marzo de 2025		Sección 5.1.1 Contenido del kit - ENVASE 1: Aumento del volumen del tampón de hibridación de 50 µl a 75 µl; aumento del volumen del potenciador del tampón de hibridación de 20 µl a 30 µl.
SG-00673 - 8.1	9 de enero de 2023		Corrección de errores de formato
SG-00673 - 8.0	5 de diciembre de 2022		Corrección de diversos errores de escritura
SG-00673 - 7.0	2 de diciembre de 2022		- Sección 5.1.2 y sección 5.3.6: corrección para añadir material autoabastecido - Corrección de diversos errores de escritura
SG-00673 - 6.0	14 de septiembre de 22		- Símbolo de marca registrada añadido a SOPHiA DDM y SOPHiA GENETICS - El nombre Library Prep Kit se ha modificado por SOPHiA GENETICS en todo el documento. - Versión del documento actualizada al siguiente número entero sin ningún decimal
SG-00673 - 5.5	19 de abril de 2022		Se han añadido las instrucciones de la aplicación web SOPHiA DDM™
SG-00157 - 5.4	14 de abril de 2022		- Limitaciones y advertencias: Modificado - Versiones de producto rectificadas - Dirección de la sede de SOPHiA GENETICS actualizada - Cambios en el laboratorio de investigación como se recomienda globalmente - Cambios en el ID del documento
ID-60101-15 - 5.3	21 de julio de 2021		- Páginas 2 y 30: cambios estéticos. - Página 18: orden de pasos cambiado. - Página 27: volumen de premezcla de PCR para 48 muestras corregido.
ID-60101-15 - 5.2	16 de junio de 2021		- Página 3: marca comercial modificada. - Página 45: añadido menor en las especificaciones del archivo. - Páginas 55 y 56: eliminado el error tipográfico del encabezado «Unique»
ID-60101-15 - 5.1	28 de mayo de 2021		- Página 2: tabla de información de resumen modificada. - Página 3: descargo de responsabilidad modificado. - Páginas 12, 14, 16 y 30: encabezado de tabla modificado. - Página 17: secuencia de los pasos 1 y 2 intercambiada. - Página 18: preparación de etanol movido a «Preparación». - Páginas 13, 19, 20, 22, 23, 24, 28, 36, 37, 38, 39 y 44: cambios estéticos y correcciones de errores tipográficos.



ID DEL DOCUMENTO/V ERSIÓN	FECHA	Versión de las Instrucciones de Uso equivalente en ingles	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO
			• Página 21: punto 1, viñeta 2 cambiada de «Potenciador FX» a «Premezcla de reacción FX». • Página 47: viñeta 2 añadida.
ID-60101-15 - 5.0	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_B.2.1.1.19_r3en - M_CEIVD_B.2.1.1.17_r3en - PM_CEIVD_B.2.1.1.15_r3en - PM_CEIVD_B.2.1.1.26_r2en • 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
4. 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. Material requerido (no suministrado)	17
4.2. Preparación de bancos	18
4.2.1. Preparación de ADN genómico	18
4.2.2. Preparación de reactivos y premezclas	20
4.2.3. Fragmentación enzimática, Reparación de extremos y formación de picos con colas A	21
4.2.4. Unión	23
4.2.5. Purificación posterior a la unión	24
4.2.6. Selección de tamaño doble	25
4.2.7. Amplificación de bancos	26
4.2.8. Purificación post-amplificación	27
4.2.9. Cuantificación de bancos individual y control de calidad	28
4.3. Captura	29
4.3.1. Agrupamiento de bancos	29
4.3.2. Hibridación	30
4.3.3. Preparación de gránulos de estreptavidina	33
4.3.4. Unión de dianas hibridadas a gránulos	33
4.3.5. Lavar gránulos de estreptavidina para retirar el ADN no unido	35
4.3.6. Amplificación post-captura	36
4.3.7. Purificación de amplificación post-captura	37
4.3.8. Cuantificación final de bancos y control de calidad	38
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. CARACTERÍSTICAS DE LA CALIDAD ANALÍTICA	45
7.2. MÉTODOS	45
7.3. DATOS (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)	47
7.4. CONCLUSIONES GENERALES (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)	47
7.5. RESULTADOS (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)	48
7.6. ESTUDIO PUENTE (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1)	49
7.7. CONCLUSIÓN	50



8. Símbolos 51

9. Asistencia 52

Anexo 1. Placas de adaptadores de indexado doble..... 53

Anexo 2. Equipos de laboratorio utilizados en el laboratorio de SOPHiA GENETICS 56

Anexo 3. Flujo de trabajo general: soluciones de captura SOPHiA DDM™..... 59

Anexo 4. Lista de regiones objetivo, regiones marcadas y problemáticas aplicables (REGIONES OBJETIVO*) 61



1. FINALIDAD/USO PREVISTOS

La SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS) es un ensayo de diagnóstico in vitro destinado a la identificación de variantes en estirpes germinales presentes en los 27 genes más comunes involucrados en la predisposición a padecer cánceres de mama o de ovario, así como cánceres intestinales, en muestras aisladas de ADN de estirpes germinales de la sangre periférica (tabla 1). La SOPHiA DDM™ Dx HCS es un ensayo de secuenciación de nueva generación (SNG) en el instrumento MiSeq® de Illumina y está previsto para su uso como ayuda a profesionales sanitarios y a fin de proporcionar información molecular para tomar una decisión clínica en relación con las mutaciones de las estirpes germinales asociadas con las enfermedades enumeradas en la tabla 1.



2. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS PRINCIPIOS DEL ENSAYO/PROCEDIMIENTO

La función confirmada del análisis SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS) es analizar datos sin procesar de SNG generados por un instrumento MiSeq® de Illumina® con un Kit de reactivos MiSeq® v3, en muestras de estirpes germinales con el SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I.

El SOPHiA DDM™ Dx HCS cuenta con tres pasos principales. El primer paso es calificar la muestra de ADN 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 el SOPHiA DDM™ Dx Mode y analizar con la aplicación SOPHiA DDM™ Dx HCS.

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

En la siguiente tabla se muestran los genes a los que se dirige SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS), que suelen estar presentes en diversos síndromes de cáncer hereditarios.

Tabla 1: Genes a los que se dirige la SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS)

ABRAXAS1	EPCAM	PMS2
APC	MLH1	PMS2CL
ATM	MRE11A	PTEN
BARD1	MSH2	RAD50
BRCA1	MSH6	RAD51C
BRCA2	MUTYH	RAD51D
BRIP1	NBN	STK11
CDH1	PALB2	TP53
CHEK2	PIK3CA	XRCC2



4. COMPONENTES DEL PRODUCTO

SOPHiA DDM™ Dx HCS 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 HCS») procesa los datos sin procesar de SNG mediante algoritmos capaces de evaluar la integridad genómica.
- El SOPHiA DDM™ Dx Mode 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 de estirpes germinales. 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			
	16 muestras KIT	32 muestras KIT	48 muestras kit	96 muestras KIT
BOX 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)
BOX 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)
- Hereditary Cancer Solution probes by SOPHiA GENETICS (18 µl)
- 2x Hybridization Buffer (75 µl)
- Hybridization Buffer Enhancer (30 µl)
- 2x Bead Wash Buffer (1250 µl)



- 10x Stringent Wash Buffer (200 µl)
- 10x Wash Buffer I (160 µl)
- 10x Wash Buffer II (110 µl)
- 10x Wash Buffer III (110 µl)
- 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)

- Dynabeads® M-270 Streptavidin (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)
- IDTE Low TE Buffer (10 ml)
- Nuclease-free water (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
HiFi PCR Master Mix 2x (in µl)	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

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

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



ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

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



Nombre del producto	PICTOGRAMA Pictograma	Declaraciones de peligro	Palabra de advertencia	Componente peligroso
		• 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	Ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica Concentración: 2,5 % CAS: 6381-92-6
10x tampón de lavado I		• H228 Sólido inflamable. • H302 Nocivo en caso de ingestión. • H315 Provoca irritación cutánea. • H318 Provoca lesiones oculares graves. • H332 Nocivo en caso de inhalación. • H401 Tóxico para los organismos acuáticos. • H402 Nocivo para los organismos acuáticos. • H412 Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. • P273 Evitar su liberación al medio ambiente. • P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. • P305+P351+P338 En caso de contacto con los ojos: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado. • P310 Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. • P501 Eliminar el contenido/recipiente de conformidad con la normativa nacional.	Peligro	Dodecilsulfato sódico Concentración: 4,9 % CAS: 151-21-3



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

Utilice  y  como equipos de protección individual.

4.1.2. 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
- HiFi PCR Master Mix 2x
- 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 descongélalos 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
DNA Ligation Buffer 5x (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
HiFi PCR Master Mix 2x (in µl)	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.

5.2.3. 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.

- 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

- 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 ADN_g (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 hágalas girar brevemente en una microcentrifugadora.
- 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.



4. 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).
5. Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces y haga girar brevemente.
6. 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 haga 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

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

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

PROCEDIMIENTO

1. 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:



- a. 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 μ l)	65	100	65	100	130	200

2. Componga la reacción de la siguiente forma:

- Con una pipeta multicanal si se procesan 8 o más muestras, añada 30 μ l de la premezcla de PCR a cada producto de unión seleccionada de tamaño doble y gránulos (volumen total: 50 μ l = 30 μ l + 20 μ l).
- 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 μ l 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 μ l de gránulos AMPure XP a cada 50 μ l 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 μ l 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.

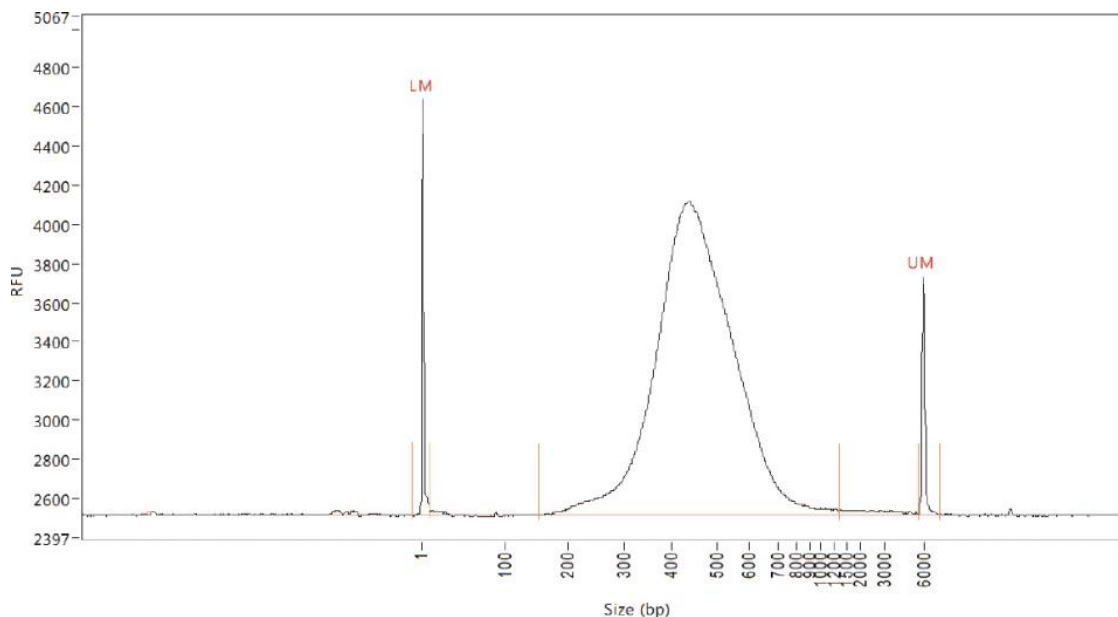
4.2.9. Cuantificación de bancos individual y control de calidad

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

5.3.1. 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



- Al llevar a cabo dos o más capturas, pipetee 7 µl de la premezcla anterior en tubos de baja unión de ADN individuales.
- 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

- Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces y haga girar brevemente.
- 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
- Sondas para Hereditary Cancer Solution
- 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 Wash Buffer III
- 10x tampón de lavado de restricción
- 2x tampón de lavado con gránulos

PREPARACIÓN

- Precaliente el termociclador a 95 °C (ajuste la tapa a 99 °C).
- 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 hibridadas a gránulos.

4.3.4. Unión de dianas hibridadas a gránulos

MATERIALES

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



PROCEDIMIENTO

Importante: Trabaje rápido para garantizar que la temperatura 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
- 10x mezcla de cebador de amplificación de bancos.
- Agua libre de nucleasas

PREPARACIÓN

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



	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (SEGUNDOS)	
Tapa	99	-	14 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
10x mezcla de cebador de amplificación de bancos (en µl).	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.

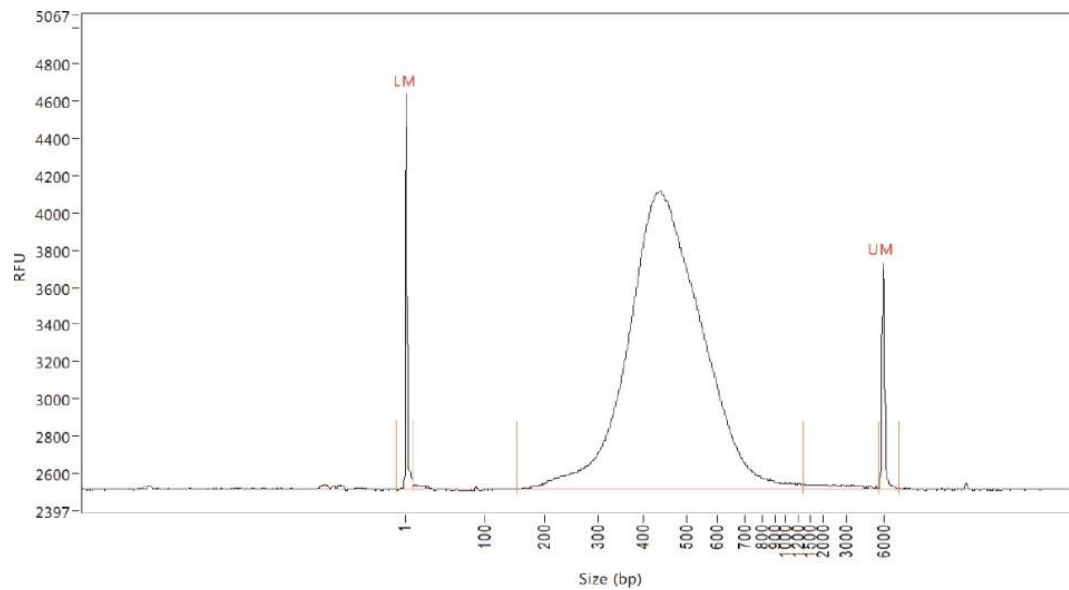
4.3.8. Cuantificación final de bancos y control de calidad

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

5.4.1. 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 1,0 millones de lecturas por muestras, con una longitud de lectura de 300 bp.

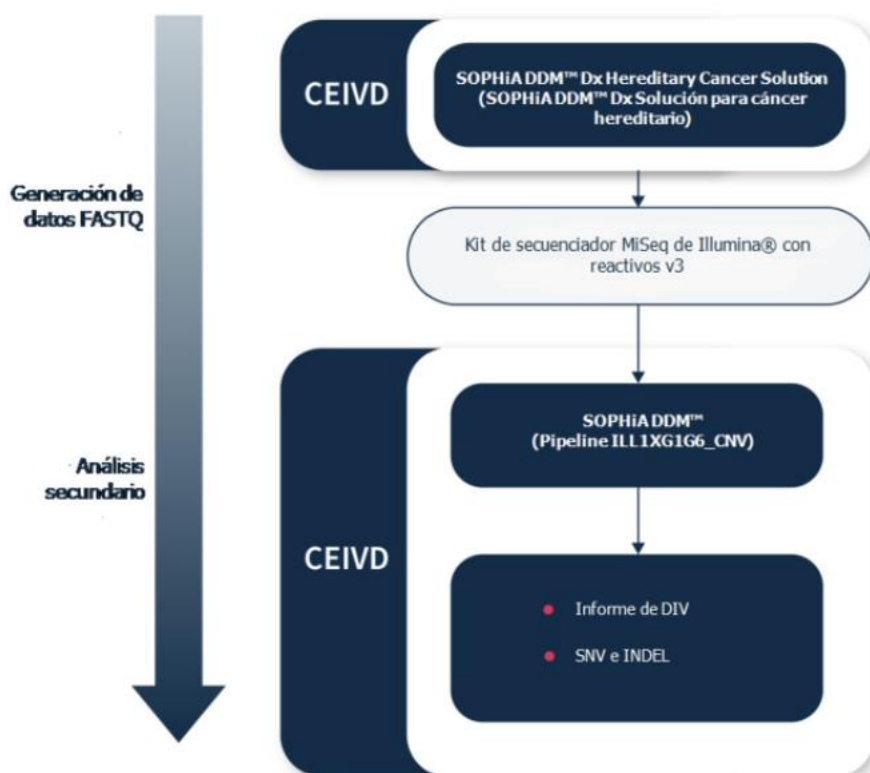


5. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

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 Hereditary Cancer 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™ Dx Mode) 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 su presencia por debajo de los límites de detección del ensayo.
- La interferencia de muestras debida al salto de índice puede dar lugar a una identificación con falsos positivos de variantes. En la mayoría de los casos, se detectarán con una fracción de variantes baja (0,1-2 %) y, por lo tanto,



se filtrarán como variantes de baja confianza. Los siguientes factores pueden agravar la interferencia de muestras debido al salto de índice y provocar fracciones de variantes más elevadas:

- 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

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.
 3. Es posible que las grandes supresiones superiores a aproximadamente 5000 bp no se representen correctamente y se pasen por alto.
 4. Es posible que se pasen por alto las inserciones grandes superiores a aproximadamente 2/3 de longitud de lectura debido a una longitud de anclaje insuficiente para la identificación del centro de inserción.
 5. Podrían pasarse por alto las duplicidades que no están totalmente cubiertas por lecturas completas (incluida la secuencia de referencia que está duplicada).
 6. En el caso de una duplicidad en tándem de longitud mayor que 1/3 de la longitud de lectura, es posible que no se determine el número exacto de repeticiones en tándem.
 7. Es posible que se detecten las inserciones Alu más largas que 2/3 de la longitud de lectura si coinciden con al menos una secuencia de la base de datos de secuencias Alu conocidas. De lo contrario, se pasarán por alto.
 8. La cuantificación de inserciones más largas que la longitud de lectura puede aumentar el riesgo de sobrestimar fracciones de variantes.
- 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 estable del análisis de datos, recomendamos una cobertura de al menos 200x. Se recomienda una cobertura mínima de 50x para una identificación de variantes fiable. Es posible que se pasen por alto variantes de regiones que muestran una cobertura inferior.
- 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 de longitud diez 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.
- Las regiones problemáticas del Anexo 4 son determinadas regiones intrónicas dentro de la objetivo y podrían causar cierta incertidumbre en la identificación de variantes. Podría estar relacionada con la tecnología de secuenciación. Se designará una variante detectada en esta región como «baja» en la tabla de confianza de SOPHiA DDM™.
- 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 variante se representa de dos formas diferentes dentro de las lecturas alineadas o parcialmente sin alinear en algunas lecturas, es posible que se subestime la fracción de variantes o que se pase por alto la variante 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 presencia de mosaicismo genético en el paciente podría derivar a una interpretación inexacta de los resultados.



7. EVALUACIÓN DE CALIDAD PRECLÍNICA

7.1. CARACTERÍSTICAS DE LA CALIDAD ANALÍTICA

El siguiente estudio está dividido en dos partes. La primera parte describe el estudio de evaluación de calidad realizado para SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0 y el kit de amplificación de bancos KAPA™. La segunda parte contiene el estudio de no regresión entre SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0 y v1.1 con el kit de amplificación de bancos KAPA™ o el SOPHiA GENETICS DNA Library Prep I Kit. Esta última parte incluye la información sobre el gen APC que se incluye en SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1.

7.2. MÉTODOS

General

En este estudio, se evaluó la calidad del kit SOPHiA DDM™ Dx HCS y del pipeline SOPHiA DDM™ Dx ILL1XG1G6_CNV con datos generados en un instrumento MiSeq® de Illumina mediante el ensayo SOPHiA DDM™ Dx HCS. Se aplicaron los filtros predeterminados relacionados con una baja cobertura (valor de corte 50X), fracción de variantes (valor de corte del 20 % para SNV, valor de corte del 15 % para INDEL) y longitud de regiones homopoliméricas (valor de corte de 10 bp). 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.

Dado que el panel SOPHiA DDM™ Dx HCS se refiere a la detección de variantes en la estirpe germinal, no fue necesario realizar evaluaciones del límite de detección (LD), ya que las fracciones de variantes esperadas son significativamente superiores a los posibles niveles de ruido de la secuenciación.

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 HCS 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 HCS 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:

Región objetivo del panel SOPHiA DDM™ Dx HCS: CDS $\pm$ 25 bp (consulte el Anexo 4 para ver una lista completa de regiones objetivo, así como las regiones marcadas y problemáticas).

Regiones sin definir: regiones con cobertura <50x

Regiones problemáticas identificadas o regiones con pseudogenes tal y como se especifica en nuestra documentación del pipeline de SOPHiA DDM™ Dx HCS (Anexo 4).

Además, las INDEL localizadas en regiones de homopolímeros por encima de 9 bp 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 intraserials 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 intraserials 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 intraserials A y B.



PV, PF, NV y NF (TP, FP, TN, FN) se calcularon sumando todas las muestras de cada ejecución. Las 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.

7.3. DATOS (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)

Las muestras disponibles se agruparon en dos categorías en función de la caracterización de alta confianza disponible para las comparaciones de referencia. Primero, SOPHiA GENETICS (Centro A (Site A)) o colaboradores externos (Centros B a G (Sites B-G)) procesaron muestras parcialmente caracterizadas con variantes de alta confianza identificadas. 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 consta de muestras clínicas y de referencia en las que se analizaron grandes porciones de las regiones objetivo de SOPHiA DDM™ Dx HCS con un pipeline de diagnóstico marcado CE-IVD, SOPHiA DDM™ Dx—BRCA—MASTR Dx—GL—MiSeq o, al menos, dos experimentos independientes de SNG donde solo se consideraban las posiciones de consenso.

7.4. CONCLUSIONES GENERALES (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)

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_01	22	343	0
SiteA_02	10	11	0
SiteA_03	11	124	0
SiteA_04	5	5	0
SiteB_01	12	27	0
SiteB_02	8	9	0
SiteC_01	12	115	0
SiteC_02	12	72	0



Ejecución	N.º de muestras	PV (TP)	NF (FN)
SiteD	13	28	0
SiteE	9	57	0
SiteF	18	286	0
SiteG	27	180	0
Total	159	1257	0

La siguiente tabla 3 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)
Ejecución A	24	665	0	0	1515530
Ejecución B	24	329	0	2	583462
Ejecución C	11	439	0	0	980668
Total	59	1433	0	2	3079660

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 90 754 bases. Se detectaron trescientas setenta y tres (373) variantes únicas en el estudio. Los negativos verdaderos se fusionaron en todas las muestras donde había disponibles datos de referencia de gran confianza y cubrían un total de 90 623 posiciones.

Tabla 4. Resúmenes de variantes de todas las ejecuciones

PV (TP)	373
PF (FP)	2
NF (FN)	0
NV (TN)	90623

7.5. RESULTADOS (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)

La combinación del instrumento MiSeq® de Illumina, el ensayo SOPHiA DDM™ Dx HCS y SOPHiA DDM™ da lugar a una calidad observada de un 100 % de sensibilidad, 99,99 % de especificidad, 99,99 % de exactitud, 99,86 % de precisión, 99,983 % de repetibilidad y 99,93 % de reproducibilidad.



Tabla 5. Resumen de la calidad

N.º	Evaluación de la calidad	Media	Percentil 5
A	Tasa específica	79,39%	[59,23%]
B	Uniformidad	99,72%	[98,24%]

N.º	Evaluación de la calidad	Observado	[IC inferior de 95 %]*
1	Sensibilidad	100%	[99,20%]
2	Especificidad	99,99%	[99,99%]
3	Exactitud	99,99%	[99,99%]
4	Precisión	99,86%	[96,42%]
5	Repetibilidad	99,98%	[99,98%]
6	Reproducibilidad	99,93%	[99,92%]

* 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 réplicas.

7.6. ESTUDIO PUENTE (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1)

SOPHiA GENETICS HCS v1.0 se ha probado exhaustivamente con anterioridad en un amplio espectro de variantes confirmadas y con muestras bien caracterizadas. Procesamos las mismas muestras con diferentes kits (SOPHiA GENETICS HCS v1.0 y SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1) y reactivos de preparación de bancos (Kit de preparación de bancos KAPA™ (KAPA™) o Kit de bancos de ADN FX Qiaseq® (Qiaseq®)) para establecer que:

- La calidad con el kit SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 y la preparación de bancos KAPA™ está a la par que la calidad con el kit SOPHiA GENETICS HCS v1.0 y la preparación de bancos KAPA™.
- La calidad con el kit SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 y la preparación de bancos Qiagen también está a la par que el SOPHiA GENETICS HCS v1.0 y la preparación de bancos KAPA™.
- Los parámetros de calidad en las nuevas regiones objetivo de SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 (CDS de APC +/- 25 bp) es alto.

Tabla 6: Comparación de resumen de la calidad de los kits

N.º	Evaluación de la calidad	Observado	[IC inferior de 95 %]**
1	Reproducibilidad de KAPA™ v1.1 frente a KAPA™ v1.0 (3 ejecuciones en 59 muestras)	99,99%	[99,99%]



N.º	Evaluación de la calidad	Observado	[IC inferior de 95 %]**
2	Reproducibilidad de Qiagen® v1.1 frente a KAPA™ v1.0 (3 ejecuciones en 23 muestras)	99,99%	[99,99%]
3	Reproducibilidad de KAPA™ (2 ejecuciones en 24 muestras)	99,95%	[99,95%]
4	Reproducibilidad de Qiagen® (2 ejecuciones en 23 muestras)	99,99%	[99,99%]
5	Reproducibilidad de KAPA™-Qiagen® (2 ejecuciones en 23 muestras)	99,99%	[99,99%]

** Se calculó un IC del 95 % en todas las posiciones de todas las muestras. La reproducibilidad se basa en las réplicas.

7.7. CONCLUSIÓN

En función de los datos analizados internamente, el kit SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 alcanzaba una calidad similar que el anterior SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0 en lo relativo a tasas específicas, regiones cubiertas, uniformidad y detección de variantes, con los kits de preparación de bancos de KAPA™ y Qiagen®. En el caso de las nuevas regiones que se dirigen al gen APC, la combinación del instrumento MiSeq® de Illumina, el ensayo SOPHiA DDM™ Dx HCS y SOPHiA DDM™ da lugar a una calidad observada de un 100 % de sensibilidad, 100 % de especificidad, 100 % de exactitud y 100 % de precisión. La reproducibilidad general con los kits de preparación de bancos KAPA™ o Qiagen® fue de más de un 99,9 %.



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	



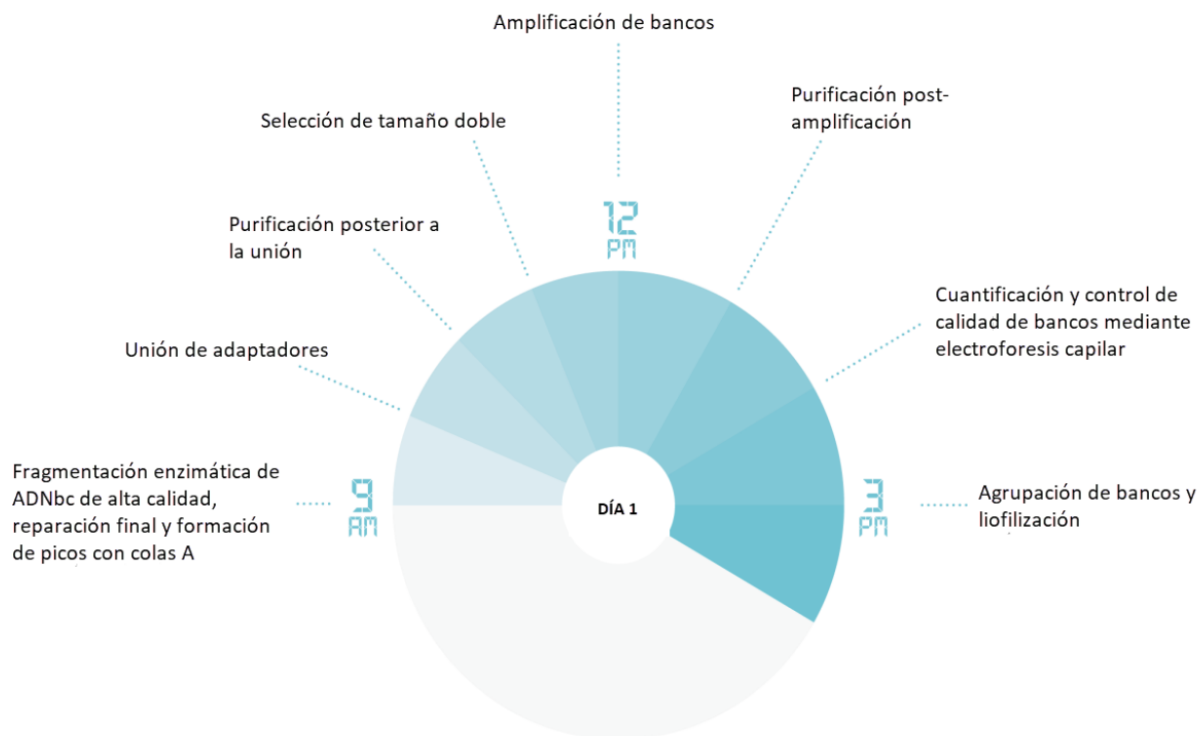
ÁREA PRE-PCR	PROVEEDOR	NOMBRE DE PRODUCTO	N.º DE CATÁLOGO
Equipo y reactivo para determinación cuantitativa fluorométrica	Thermo Fisher Scientific	Kit de ensayo de ADNdc HS Qubit y fluorímetro Qubit 3.0	Q33216 y Q32854
Pipetas monocal (P10; P100; P200; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100- 1100,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

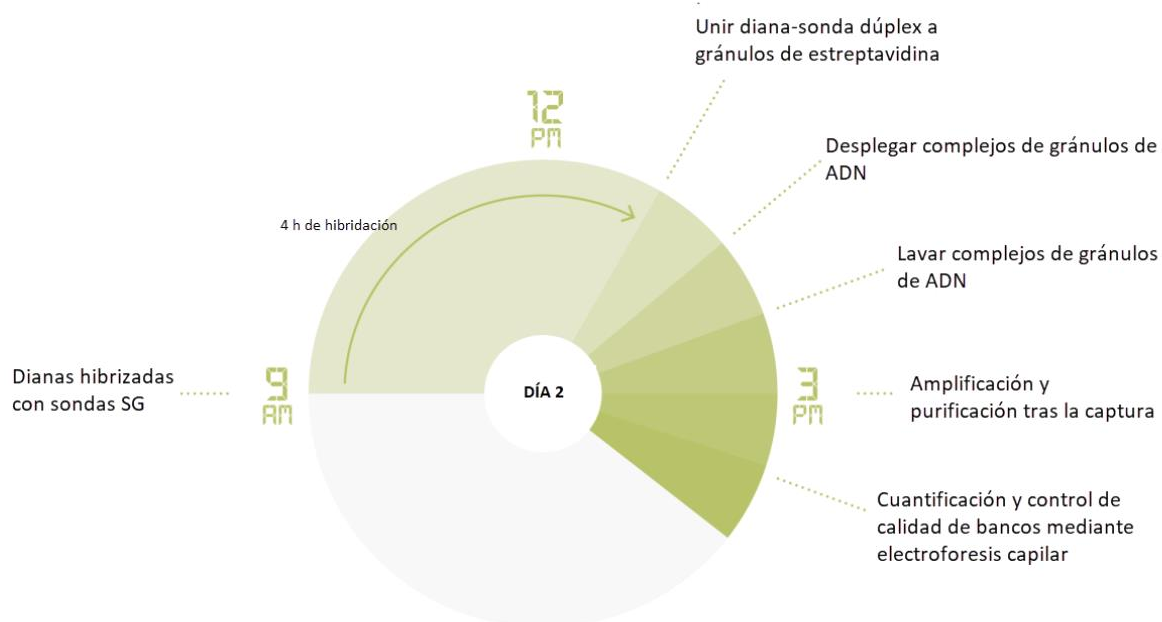




ANEXO 3. FLUJO DE TRABAJO GENERAL: SOLUCIONES DE CAPTURA SOPHIA DDM™



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, REGIONES MARCADAS Y PROBLEMÁTICAS APLICABLES (REGIONES OBJETIVO*)

Regiones objetivo		
CROMOSOMA	INICIO	FIN
1	45794953	45795134
1	45796163	45796254
1	45796829	45797031
1	45797067	45797253
1	45797308	45797546
1	45797670	45797783
1	45797813	45798007
1	45798038	45798185
1	45798221	45798384
1	45798410	45798531
1	45798565	45798656
1	45798744	45798867
1	45798932	45799021
1	45799060	45799300
1	45800038	45800208
1	45805866	45805951
2	47596620	47596745
2	47600577	47600734
2	47600922	47601212
2	47602348	47602463
2	47604128	47604241
2	47606067	47606218
2	47606883	47607069
2	47612280	47612374
2	47613686	47613777
2	47630306	47630566
2	47635515	47635719
2	47637208	47637536



CROMOSOMA	INICIO	FIN
2	47639528	47639724
2	47641383	47641582
2	47643410	47643593
2	47656871	47657105
2	47672662	47672821
2	47690145	47690318
2	47693772	47693972
2	47698079	47698226
2	47702139	47702434
2	47703481	47703735
2	47705386	47705683
2	47707810	47708035
2	47709893	47710113
2	48010348	48010657
2	48018041	48018287
2	48023008	48023227
2	48025725	48028319
2	48030534	48030849
2	48032024	48032191
2	48032732	48032871
2	48033318	48033522
2	48033566	48033815
2	48033893	48034024
2	215593375	215593757
2	215595110	215595257
2	215609766	215609908
2	215610421	215610603
2	215617146	215617304
2	215632181	215632403
2	215633931	215634061
2	215645259	215646258
2	215656996	215657194



CROMOSOMA	INICIO	FIN
2	215661760	215661866
2	215674111	215674318
3	37035014	37035179
3	37038085	37038225
3	37042421	37042569
3	37045867	37045990
3	37048457	37048579
3	37050280	37050421
3	37053286	37053378
3	37053477	37053615
3	37055898	37056060
3	37058972	37059115
3	37061776	37061979
3	37067103	37067523
3	37070250	37070448
3	37081652	37081810
3	37083734	37083847
3	37088985	37089199
3	37089983	37090125
3	37090370	37090533
3	37091952	37092169
3	178916589	178916990
3	178917453	178917712
3	178919053	178919353
3	178921307	178921602
3	178922266	178922401
3	178927358	178927513
3	178927949	178928151
3	178928194	178928378
3	178935973	178936147
3	178936959	178937090
3	178937334	178937548



CROMOSOMA	INICIO	FIN
3	178937712	178937865
3	178938749	178938970
3	178941844	178942000
3	178942463	178942634
3	178943725	178943853
3	178947035	178947255
3	178947767	178947934
3	178947988	178948189
3	178951857	178952177
4	84383597	84384080
4	84384622	84384786
4	84388582	84388716
4	84390160	84390329
4	84391331	84391574
4	84393350	84393466
4	84397771	84397857
4	84403282	84403422
4	84406114	84406250
5	112043390	112043604
5	112090563	112090747
5	112101998	112102132
5	112102861	112103112
5	112111301	112111459
5	112116462	112116625
5	112128118	112128251
5	112136951	112137105
5	112151167	112151315
5	112154638	112155066
5	112157568	112157713
5	112162780	112162969
5	112163601	112163728
5	112164528	112164694



CROMOSOMA	INICIO	FIN
5	112170623	112170887
5	112173225	112179848
5	131892992	131893170
5	131894951	131895084
5	131911444	131911645
5	131914984	131915219
5	131915529	131915783
5	131923229	131923407
5	131923591	131923806
5	131924354	131924597
5	131925298	131925554
5	131926891	131927123
5	131927544	131927751
5	131930536	131930761
5	131931240	131931527
5	131938967	131939206
5	131939587	131939763
5	131940473	131940716
5	131944282	131944442
5	131944784	131944926
5	131944950	131945113
5	131951670	131951751
5	131951754	131951847
5	131953737	131954011
5	131972782	131972917
5	131973748	131973940
5	131976339	131976522
5	131977845	131978081
7	6013005	6013198
7	6017194	6017413
7	6018202	6018352
7	6022430	6022647



CROMOSOMA	INICIO	FIN
7	6026365	6027276
7	6029406	6029611
7	6031579	6031713
7	6035140	6035289
7	6036932	6037079
7	6038714	6038931
7	6042059	6042292
7	6043296	6043448
7	6043578	6043714
7	6045498	6045687
7	6048603	6048675
7	6776682	6777592
7	6781291	6781508
7	6785694	6785844
7	6786642	6786861
7	6790855	6791257
7	152345702	152346473
7	152357761	152357892
7	152373101	152373189
8	90947785	90947865
8	90949229	90949328
8	90955456	90955619
8	90958343	90958548
8	90960027	90960145
8	90965447	90965944
8	90967486	90967808
8	90970928	90971107
8	90976613	90976760
8	90982567	90982810
8	90983376	90983543
8	90990423	90990576
8	90992937	90993146



CROMOSOMA	INICIO	FIN
8	90993578	90993776
8	90994925	90995108
8	90996728	90996814
10	89624202	89624330
10	89653757	89653891
10	89685245	89685339
10	89690778	89690871
10	89692745	89693033
10	89711850	89712041
10	89717585	89717801
10	89720626	89720900
10	89725019	89725254
11	94153266	94153372
11	94163052	94163177
11	94168973	94169090
11	94170318	94170426
11	94178951	94179084
11	94180360	94180629
11	94189417	94189529
11	94192549	94192772
11	94194077	94194227
11	94197254	94197430
11	94200954	94201084
11	94203612	94203833
11	94204715	94204950
11	94209430	94209594
11	94211876	94212067
11	94212815	94212952
11	94219065	94219275
11	94223974	94224156
11	94225923	94225992
11	108098327	108098448



CROMOSOMA	INICIO	FIN
11	108098478	108098640
11	108099880	108100075
11	108106372	108106586
11	108114655	108114870
11	108115490	108115778
11	108117666	108117879
11	108119635	108119854
11	108121403	108121824
11	108122539	108122783
11	108123519	108123664
11	108124516	108124791
11	108126917	108127092
11	108128183	108128358
11	108129688	108129827
11	108137873	108138094
11	108139112	108139361
11	108141766	108141898
11	108141953	108142158
11	108143234	108143359
11	108143424	108143604
11	108150193	108150360
11	108151697	108151920
11	108153412	108153631
11	108154929	108155225
11	108158302	108158467
11	108159679	108159855
11	108160304	108160553
11	108163321	108163545
11	108164015	108164229
11	108165629	108165811
11	108167989	108168134
11	108170416	108170637



CROMOSOMA	INICIO	FIN
11	108172350	108172541
11	108173555	108173781
11	108175377	108175604
11	108178599	108178736
11	108180862	108181067
11	108183113	108183250
11	108186525	108186663
11	108186713	108186865
11	108188075	108188273
11	108190656	108190810
11	108192003	108192172
11	108196012	108196296
11	108196760	108196977
11	108198347	108198510
11	108199723	108199990
11	108200916	108201173
11	108202146	108202309
11	108202581	108202789
11	108203464	108203652
11	108204588	108204720
11	108205671	108205861
11	108206547	108206713
11	108213924	108214123
11	108216445	108216660
11	108217981	108218117
11	108224468	108224632
11	108225513	108225626
11	108235784	108235970
11	108236027	108236260
13	32890573	32890689
13	32893189	32893487
13	32899188	32899346



CROMOSOMA	INICIO	FIN
13	32900213	32900312
13	32900354	32900444
13	32900611	32900775
13	32903555	32903654
13	32905031	32905192
13	32906384	32907549
13	32910377	32915358
13	32918670	32918815
13	32920939	32921058
13	32928973	32929450
13	32930540	32930771
13	32931854	32932091
13	32936635	32936855
13	32937291	32937695
13	32944514	32944719
13	32945068	32945262
13	32950782	32950953
13	32953429	32953677
13	32953862	32954075
13	32954119	32954307
13	32968801	32969095
13	32971010	32971206
13	32972274	32972932
16	23614755	23615015
16	23619160	23619358
16	23625300	23625437
16	23632667	23632824
16	23634265	23634476
16	23635305	23635440
16	23637532	23637743
16	23640500	23640621
16	23640936	23641815



CROMOSOMA	INICIO	FIN
16	23646158	23647680
16	23649146	23649298
16	23649366	23649475
16	23652406	23652503
16	68771294	68771391
16	68772175	68772339
16	68835548	68835821
16	68842302	68842495
16	68842571	68842776
16	68844075	68844269
16	68845562	68845787
16	68846013	68846191
16	68847191	68847423
16	68849393	68849687
16	68853158	68853353
16	68855879	68856153
16	68857277	68857554
16	68862052	68862232
16	68863532	68863725
16	68867168	68867427
17	7572902	7573033
17	7573902	7574058
17	7576568	7576682
17	7576828	7576951
17	7576994	7577180
17	7577474	7577633
17	7578152	7578314
17	7578346	7578579
17	7579287	7579615
17	7579675	7579746
17	7579814	7579937
17	33427947	33428080



CROMOSOMA	INICIO	FIN
17	33428195	33428409
17	33430248	33430368
17	33430448	33430588
17	33433380	33433525
17	33433982	33434166
17	33434360	33434491
17	33443909	33444081
17	33445495	33445663
17	33446105	33446216
17	33446526	33446657
17	41197670	41197844
17	41199635	41199745
17	41201113	41201236
17	41203055	41203159
17	41209044	41209177
17	41215325	41215415
17	41215866	41215993
17	41219600	41219737
17	41222920	41223280
17	41226323	41226563
17	41228480	41228656
17	41231326	41231441
17	41234396	41234617
17	41242936	41243074
17	41243427	41246902
17	41247838	41247964
17	41249236	41249331
17	41251767	41251922
17	41256114	41256303
17	41256860	41256998
17	41258448	41258575
17	41267718	41267821



CROMOSOMA	INICIO	FIN
17	41276009	41276138
17	56769980	56770174
17	56772267	56772579
17	56774029	56774245
17	56780532	56780715
17	56787195	56787376
17	56798082	56798198
17	56801376	56801486
17	56809820	56809930
17	56811454	56811608
17	59760632	59761526
17	59763172	59763551
17	59770766	59770898
17	59793287	59793449
17	59820349	59820520
17	59821768	59821977
17	59853737	59853948
17	59857597	59857787
17	59858176	59858391
17	59861606	59861810
17	59870933	59871115
17	59876436	59876685
17	59878589	59878860
17	59885803	59886143
17	59924437	59924606
17	59926465	59926642
17	59934394	59934617
17	59937132	59937293
17	59938783	59938925
19	1206888	1207227
19	1218391	1218524
19	1219298	1219431



CROMOSOMA	INICIO	FIN
19	1220347	1220529
19	1220555	1220741
19	1221187	1221364
19	1221923	1222030
19	1222959	1223196
19	1226428	1226671
22	29083860	29083999
22	29085098	29085228
22	29089995	29090130
22	29091090	29091255
22	29091673	29091886
22	29092864	29093000
22	29095801	29095950
22	29099468	29099579
22	29105969	29106072
22	29107872	29108030
22	29115358	29115498
22	29120940	29121137
22	29121206	29121380
22	29130366	29130734

*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 PROBLEMÁTICAS APLICABLES**

CROMOSOMA	INICIO	FIN
chr2	48018282	48018315
chr3	37067075	37067120
chr5	112111309	112111311
chr11	94152620	94152662
chr17	59757835	59757859



**Una región problemática es una determinada región intrónica dentro de la diana y podría causar cierta incertidumbre en la identificación de variantes. Podría estar relacionada con la tecnología de secuenciación. Una variante detectada en esta región se situará baja en la Tabla de confianza de SOPHiA DDM™. La columna de filtro de la variante correspondiente en la tabla final de todas las variantes se marcará como «regiones problemáticas». Las coordenadas se basan en 1 y la coordenada final se incluye en la región.

REGIONES MARCADAS APLICABLES***

Regiones marcadas aplicables			
CROMOSOMA	INICIO	FIN	DESCRIPCIÓN
2	47635515	47635560	Los artefactos de secuenciación pueden confundir las variantes de esta región
2	48032732	48032820	Los artefactos de secuenciación pueden confundir las variantes de esta región
3	37067103	37067240	Los artefactos de secuenciación pueden confundir las variantes de esta región
7	6036932	6037079	Los artefactos de secuenciación pueden confundir las variantes de esta región
3	178937334	178937548	La región es muy similar a otra región genómica (la región con mayor similitud es chr22:17053913- 17054324, hg19/GRCh37) - las variantes se deben interpretar con precaución
3	178937712	178937865	La región es muy similar a otra región genómica (la región con mayor similitud es chr22:17054288- 17054442, hg19/GRCh37) - las variantes se deben interpretar con precaución
7	6012845	6013198	La región es muy similar a otra región genómica (la región con mayor similitud está en el pseudogén PMS2CL, chr7:6790854- 6791209, hg19/GRCh37) - las variantes se deben interpretar con precaución
7	6017194	6017413	La región es muy similar a otra región genómica (la región con mayor similitud está en el pseudogén PMS2CL, chr7:6786641- 6786861, hg19/GRCh37) - las variantes se deben interpretar con precaución
7	6018202	6018352	La región es muy similar a otra región genómica (la región con mayor similitud está en el pseudogén PMS2CL, chr7:6785693- 6785844, hg19/GRCh37) - las variantes se deben interpretar con precaución
7	6022430	6022647	La región es muy similar a otra región genómica (la región con mayor similitud está en el pseudogén PMS2CL, chr7:6781290- 6781508, hg19/GRCh37) - las variantes se deben interpretar con precaución



CROMOSOMA	INICIO	FIN	DESCRIPCIÓN
7	6026365	6027276	La región es muy similar a otra región genómica (la región con mayor similitud está en el pseudogén PMS2CL, chr7:6776681-6777592, hg19/GRCh37) - las variantes se deben interpretar con precaución
7	6776682	6777592	La región es muy similar a otra región genómica (la región con mayor similitud está en el pseudogén PMS2, chr7:6026364-6027276, hg19/GRCh37) - las variantes se deben interpretar con precaución
7	6781291	6781508	La región es muy similar a otra región genómica (la región con mayor similitud está en el gen PMS2, chr7:6022429-6022647, hg19/GRCh37) - las variantes se deben interpretar con precaución
7	6785694	6785844	La región es muy similar a otra región genómica (la región con mayor similitud está en el gen PMS2, chr7:6018201-6018352, hg19/GRCh37) - las variantes se deben interpretar con precaución
7	6786642	6786861	La región es muy similar a otra región genómica (la región con mayor similitud está en el gen PMS2, chr7:6017193-6017413, hg19/GRCh37) - las variantes se deben interpretar con precaución
7	6790855	6791257	La región es muy similar a otra región genómica (la región con mayor similitud está en el gen PMS2, chr7:6012796-6013198, hg19/GRCh37) - las variantes se deben interpretar con precaución
22	29085098	29085228	La región es muy similar a otra región genómica (la región con mayor similitud es chr16:33366704-33366835, hg19/GRCh37) - las variantes se deben interpretar con precaución

***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™, 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 01:11:40 GMT+0000
QA Approval Verdict: Approve	Claire Mullane, (cmullane@sophiagenetics.com) Quality Assurance Approval 28-Jan-2026 08:53:34 GMT+0000