



Instrucciones de uso

Inherited CardioKitDx

Ref. IMG-390



Fabricado por:

HEALTH IN CODE, S.L.

Calle de la Travesía s/n, 15E Base 5, Valencia 46024, España
+34 963 212 340 - info@healthincode.com

healthincode.com

Código: HIC-PT-KIT 03-F-03 V.03

healthincode

Health in Code, S.L. le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de fabricación. Esta garantía se hace extensible hasta la fecha de caducidad, siempre que se observen las condiciones de conservación especificadas en este manual.

Este producto está diseñado para diagnóstico *in vitro*. Health in Code, S.L. no le ofrece ninguna otra garantía, expresa o implícita, que se extienda más allá del funcionamiento correcto de los componentes de este kit. La única obligación de Health in Code, S.L., respecto de las garantías precedentes, será la de reemplazar los productos, o bien devolver el precio de la compra de los mismos, a voluntad del cliente, siempre y cuando se pruebe la existencia de un defecto en los materiales, o bien en la elaboración de sus productos. Health in Code, S.L. no será responsable de ningún daño, directo o indirecto, que resulte en pérdidas económicas o en daños que pudieran producirse por el uso de este producto por parte del comprador o usuario.

Todos los productos comercializados por Health in Code, S.L. son sometidos a un riguroso control de calidad. **Inherited CardioKitDx** ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada lote fabricado.

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con el Departamento Técnico:

 +34 963 212 340

 tech.support@healthincode.com

Modificaciones de las Instrucciones de Uso (IFU)		
Versión 08	DIC 2023	Revisión y actualización del apartado "3. Características técnicas".
Versión 07	SEP 2023	Revisión del contenido de los apartados 7.2.1, 7.2.2, 7.7, 9 y 10. Cambio de la nomenclatura de la caja anteriormente llamada "Magnis Empty Consumables". Corrección del número de index (apartado 5) Cambio del material "Sample input strip" de la caja 1 a la 4 (apartado 5)
Versión 06	NOV 2022	Cambio de dirección del fabricante: Health in Code S.L., Calle de la Travesía s/n, 15E Base 5, Valencia 46024, España.
Versión 05	OCT 2022	Actualización de los apartados 3, 5 y 10. Actualización del control de calidad de las librerías pre-captura y post-captura (apartados 7.6.1 y 7.6.2).
Versión 04	MAY 2022	Actualización por mercado CE/IVD del producto y cambio de la identificación del fabricante: de Imagen a HEALTH IN CODE S.L.
Versión 03	DIC 2021	Actualización apartado 7.2.2
Versión 02	NOV 2021	Actualización apartados 2, 3 y 6
Versión 01	OCT 2021	Creación del documento

índice

01	Información general	4
02	Uso previsto	5
03	Características técnicas	8
04	Advertencias y precauciones	9
05	Contenido y condiciones de almacenamiento del kit	10
06	Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran	12
07	Protocolo de ensayo	14
07.1	Preparación del instrumento Magnis para ejecutar un protocolo	14
07.2	Preparación y fragmentación del ADN molde	15
07.3	Preparación de los reactivos y fungible empleado en el sistema Magnis	19
07.4	Ejecución del protocolo de preparación de las librerías	21
07.5	Limpieza del equipo después de un ensayo	30
07.6	Validación y cuantificación de las librerías	30
07.7	Desnaturalización de las librerías	32
07.8	Configuración de la plataforma NextSeq	33
08	Análisis de los resultados	34
08.1	Envío de los ficheros de secuenciación	34
08.2	Acceso a la plataforma y gestión de solicitudes	35
08.3	Estadísticos de cobertura	36
08.4	Filtrado de variantes	37
08.5	Categorización de las variantes	38
08.6	Análisis de grandes reordenamientos (CNVs)	39
09	Troubleshooting	42
10	Limitaciones	46
10.1	Analíticas	46
10.2	Equipos	47
10.3	Reactivos	48
10.4	Plataforma de análisis bioinformático	48
10.5	Estabilidad del producto	48

01 Información general

Las enfermedades cardiovasculares hereditarias, incluidas las miocardiopatías y canalopatías, son afecciones heterogéneas de características morfológico y funcional, presentación clínica, evolución y pronóstico muy variables. Cientos de mutaciones en diferentes genes han sido asociadas con cada una de estas enfermedades y es probable que esta heterogeneidad genética sea uno de los principales motivos de la variabilidad en su expresión clínica.

La información de los estudios genéticos puede ayudar a los clínicos a diagnosticar las enfermedades en etapas tempranas, a identificar a los familiares en riesgo, a los que no requieren un seguimiento periódico, así como proporcionar información pronóstica. Se requiere una interpretación adecuada y precisa de las pruebas genéticas para obtener todas las ventajas potenciales de estos estudios. Esta interpretación no es sencilla y requiere información, conocimientos especializados y dedicación.

El kit **Inherited CardioKitDx** es una herramienta de orientación clínica destinada a ayudar a los profesionales de la salud en el manejo de las enfermedades cardiovasculares hereditarias.

02 Uso previsto

Inherited CardioKitDx está enfocado al estudio de cardiomiopatías (aquellas asociadas con elevado riesgo a desarrollarlas, muerte súbita o arritmias supraventriculares (arritmias por fibrilación), canalopatías y enfermedades de conducción cardiaca. Ha sido diseñado principalmente para el diagnóstico de escenarios clínicos en los que no es posible establecer un fenotipo claramente definido, pero en el que los pacientes presentan arritmias cardiacas como principal manifestación, y destinado principalmente a individuos con antecedentes familiares de muerte súbita e historial de síncope de origen indeterminado con fibrilación ventricular que reúnen las características anteriormente mencionadas. Todos los genes relacionados con las enfermedades que pueden producir fenotipo arrítmico, asociados o no a la presencia de cardiopatía estructural, están incluidos en el kit.

El kit **Inherited CardioKitDx** está compuesto por 261 genes relacionados con cardiomiopatías y canalopatías y ha sido diseñado para asegurar la captura de todas las regiones codificantes +/- 50pb (para algunos genes el diseño considera también la captura de regiones intrónicas más profundas), así como promotores clínicamente relevantes y zonas UTR.

Los genes incluidos en el panel son los siguientes:

A2ML1, AARS2, ABCC9, ACAD9, ACADVL, ACTA1, ACTC1, ACTN2, AGK, AGL, AGPAT2, AKAP9, AKT1, ALMS1, ALPK3, ANK2, ANK3, ANKRD1, ANO5, ATP5F1E, ATPAF2, BAG3, BRAF, BSCL2, C10orf71, CACNA1C, CACNA1D, CACNA2D1, CACNB2, CALM1, CALM2, CALM3, CALR, CALR3, CAPN3, CASQ2, CASZ1, CAV3, CAVIN1, CAVIN4, CBL, CDH2, COA5, COA6, COL7A1, COQ2, COX15, COX6B1, CRYAB, CSNK1A1, CSRP3, CTNNA1, CTNNA3, CTNNB1, CHRM2, DES, DLD, DMD, DNAJC19, DNML, DOLK, DSC2, DSG2, DSP, DTNA, ELAC2, EMD, EYA4, FAH, FBXO32, FGF12, FHL1, FHL2, FHOD3, FKRP, FKTN, FLNC, FOXD4, FOXRED1, FXN, GAA, GATA4, GATA5, GATA6, GATAD1, GFM1, GJA1, GJA5, GLA, GLB1, GNB2, GNPTAB, GPD1L, GREM2, GSK3B, GUSB, GYG1, HCN4, HFE, HRAS, IDH2, ILK, IRX3, ISM2, JARID2, JPH2, JUP, KAT6B, KCNA5, KCND2, KCND3, KCNE1, KCNE2, KCNE3, KCNE5, KCNH2, KCNJ2, KCNJ5, KCNJ8, KCNK17, KCNK3, KCNQ1, KLF10, KLHL24, KRAS, LAMA2, LAMA4, LAMP2, LDB3, LDLR, LIAS, LMNA, LMOD2, LZTR1, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K8, MEF2C, MIB1, MIR208A, MIR208B, MLYCD, MRPL3, MRPL44, MRPS22, MTO1, MYBPC3, MYBPHL, MYH11, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MYLK2, MYOM1, MYOT, MYOZ2, MYPN, NEBL, NEXN, NF1, NKX2-5, NKX2-6, NNT, NONO, NOS1AP, NOTCH1, NPPA, NRAP, NRAS, OBSCN, OBSL1, OPA3, PDHA1, PDLIM3, PERP, PHKA1, PITX2, PKD2, PKP2, PKP4, PLN, PMM2, PPA2, PPCS, PPP1CB, PPP1R13L, PRDM16, PRKAG2, PSEN1, PSEN2, PTPN11, QRSL1, RAF1, RANGRF, RASA1, RASA2, RBM20, RBM24, RIT1, RRAS, RYR2, SCN10A, SCN1B, SCN2B, SCN3B, SCN4B, SCN5A, SCO2, SDHA, SGCA, SGCB, SGCD, SGCG, SHOC2, SLC22A5, SLC25A3, SLC25A4, SLMAP, SNTA1, SOS1, SOS2, SPEG, SPRED1, SPRY1, SRY, SURF1, SYNE1, SYNE2, SYNGAP1, TAZ, TBX20, TBX5, TCAP, TECRL, TGFB3, TMEM175, TMEM43, TMEM70, TMOD1, TNNC1, TNNI3, TNNI3K, TNNT2, TOR1AIP1, TPM1, TRDN, TRIM54, TRIM63, TRPM4, TSFM, TTN, TTR, TXNRD2, VCL, WISP1, WT1, XK, ZBTB17, ZFH3 y ZFPM2

Este kit, en combinación con los análisis bioinformáticos y las herramientas de análisis diseñadas para tal fin, permiten la detección de SNPs, pequeñas indels y variantes de número de copias, junto con la anotación de variante opcional y la interpretación clínica de los resultados.

A continuación, se describen los paneles de genes incluidos en el kit **Inherited CardioKitDx** según la enfermedad a estudiar:

➤ Cardiomiopatía hipertrófica [118 genes]

AARS2, ACAD9, ACADVL, ACTA1, ACTC1, ACTN2, AGK, AGL, AGPAT2, AKT1, ALPK3, ANK2, ANKRD1, ATP5F1E, ATPAF2, BAG3, BRAF, BSCL2, C10orf71, CACNA1C, CALR, CALR3, CASQ2, CAV3, CAVIN4, CBL, CDH2, COA5, COA6, COQ2, COX15, COX6B1, CRYAB, CSRP3, DES, DLD, DSP, ELAC2, FAH, FHL1, FHL2, FHOD3, FLNC, FOXRED1, FXN, GAA, GATA6, GFM1, GLA, GLB1, GNPTAB, GUSB, GYG1, HRAS, JPH2, KCNJ8, KLF10, KLHL24, KRAS, LAMP2, LDB3, LIAS, LMNA, LZTR1, MAP2K1, MAP2K2, MEF2C, MLYCD, MRPL3, MRPL44, MRPS22, MTO1, MYBPC3, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MYLK2, MYOM1, MYOZ2, NEXN, NF1, NRAS, PDHA1, PDLIM3, PHKA1, PLN, PMM2, PPA2, PPP1CB, PRKAG2, PTPN11, QRSL1, RAF1, RIT1, SCO2, SHOC2, SLC22A5, SLC25A3, SLC25A4, SOS1, SOS2, SURF1, TAZ, TCAP, TMEM70, TMOD1, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, TRIM54, TRIM63, TSFM, TTN, TTR, VCL, WISPI

➤ Cardiomiopatía dilatada [121 genes]

ABCC9, ACTA1, ACTC1, ACTN2, AKT1, ALMS1, ALPK3, ANKRD1, ANO5, BAG3, BRAF, CALR3, CASZ1, CAV3, CAVIN4, CHRM2, COL7A1, CRYAB, CSRP3, DES, DMD, DNAJC19, DNML, DOLK, DSC2, DSG2, DSP, DTNA, EMD, EYA4, FBXO32, FHL1, FHL2, FHOD3, FKRP, FKTN, FLNC, GAA, GATA4, GATA5, GATA6, GATAD1, GLA, GLB1, GSK3B, GYG1, HFE, IDH2, ILK, JARID2, JUP, KCNJ2, LAMA2, LAMA4, LAMP2, LDB3, LMNA, LMOD2, MEF2C, MIB1, MYBPC3, MYBPC3, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MYOT, MYPN, NEBL, NEXN, NKX2-5, NONO, NRAP, OBSCN, OPA3, PDLIM3, PKD2, PKP2, PLN, PPA2, PPCS, PPP1R13L, PRDM16, PRKAG2, PSEN1, PSEN2, PTPN11, QRSL1, RAF1, RBM20, RBM24, RYR2, SCN5A, SDHA, SGCA, SGCB, SGCD, SGCG, SLC22A5, SPEG, SYNE1, SYNE2, TAZ, TBX20, TCAP, TMEM43, TMOD1, TNNC1, TNNI3, TNNI3K, TNNT2, TOR1AIP1, TPM1, TRIM63, TTN, TTR, TXNRD2, VCL, WISPI, XK, ZBTB17

➤ Cardiopatía arritmogénica [26 genes]

CASQ2, CDH2, CTNNA1, CTNNA3, CTNNB1, DES, DSC2, DSG2, DSP, EMD, FLNC, ILK, ISM2, JUP, LMNA, PERP, PKP2, PKP4, PLN, PPP1R13L, RBM20, RYR2, SCN5A, TGFB3, TMEM43, TTN

➤ Miocardiopatía no compactada [48 genes]

ACTC1, ACTN2, AKT1, ANKRD1, BAG3, CDH2, CSRP3, DMD, DNAJC19, DSP, DTNA, FHL1, FHOD3, FLNC, HCN4, JARID2, KCNH2, KCNQ1, KRAS, LAMP2, LDB3, LMNA, MIB1, MLYCD, MYBPC3, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, NKX2-5, NNT, NONO, NOTCH1, PLN, PRDM16, PTPN11, RBM20, RYR2, SPEG, TAZ, TBX20, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, TRPM4, TTN, WT1

➤ **Cardiomiopatía restrictiva [23 genes]**

ACTC1, ACTN2, ALMS1, BAG3, CRYAB, DES, FHL1, FHOD3, FLNC, GLA, HFE, LMNA, MYBPC3, MYH7, MYL2, MYL3, MYPN, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, TTN, TTR

➤ **Síndromes RASopáticos [26 genes]**

A2ML1, ALPK3, BRAF, CBL, HRAS, KAT6B, KRAS, LZTR1, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K8, NF1, NRAS, PPPICB, PTPN11, RAF1, RASA1, RASA2, RIT1, RRAS, SHOC2, SOS1, SOS2, SPRED1, SPRY1, SYNGAP1

➤ **Síndrome QT largo [32 genes]**

AKAP9, ANK2, CACNA1C, CALM1, CALM2, CALM3, CAV3, CAVIN1, FHL2, HCN4, KCNA5, KCND2, KCND3, KCNE1, KCNE2, KCNE3, KCNE5, KCNH2, KCNJ2, KCNJ5, KCNQ1, NOS1AP, RYR2, SCN1B, SCN3B, SCN4B, SCN5A, SLC22A5, SNTA1, TECRL, TRDN, TRPM4

➤ **Síndrome de la Onda J [27 genes]**

ABCC9, ANK2, ANK3, CACNA1C, CACNA1D, CACNA2D1, CACNB2, FGF12, GPD1L, HCN4, IRX3, KCND2, KCND3, KCNE3, KCNE5, KCNH2, KCNJ8, PKP2, RANGRF, SCN10A, SCN1B, SCN2B, SCN3B, SCN4B, SCN5A, SLMAP, TRPM4

➤ **Síndrome de QT corto [9 genes]**

CACNA1C, CACNA1D, CACNA2D1, CACNB2, KCNH2, KCNJ2, KCNQ1, SLC22A5, TMEM175

➤ **Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica [10 genes]**

ANK2, CALM1, CALM2, CALM3, CASQ2, KCNJ2, RYR2, SCN5A, TECRL, TRDN

➤ **Desórdenes de conducción cardíaca [44 genes]**

ACTC1, CACNA1D, CALR, CAVIN4, DES, DSC2, DSG2, DSP, EMD, GAA, GATA4, GJA5, GLA, GNB2, HCN4, HFE, IRX3, JUP, KCNE2, KCNH2, KCNJ2, KCNK17, KCNQ1, LAMP2, LDB3, LMNA, MYBPHL, MYH6, MYH7, NKX2-5, NPPA, PITX2, PKP2, PRKAG2, RYR2, SCN1B, SCN4B, SCN5A, SLC22A5, SLMAP, TBX5, TNNI3K, TRPM4, TTR

➤ **Fibrilación auricular [46 genes]**

ABCC9, ACTC1, CACNB2, EMD, GATA4, GATA5, GATA6, GJA1, GJA5, GNB2, GREM2, HCN4, IRX3, JPH2, KCNA5, KCND2, KCND3, KCNE1, KCNE2, KCNE3, KCNE5, KCNH2, KCNJ2, KCNJ5, KCNJ8, KCNK3, KCNQ1, LMNA, MYBPHL, NKX2-5, NKX2-6, NPPA, PITX2, RYR2, SCN1B, SCN2B, SCN3B, SCN4B, SCN5A, TBX5, TNNI3, TNNI3K, TNNT2, TPM1, TTR, ZFH3

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

03 Características técnicas

Inherited CardioKitDx ha sido validado en la plataforma *NextSeq 500/550 System* de Illumina mediante el análisis de muestras de ADN de referencia procedentes de *Coriell Institute* y muestras de ADN genotipadas de la colección Health in Code, S.L. En dicha validación se ha verificado la detección específica de las variantes presentes en los genes seleccionados (ver apartado anterior) así como la repetibilidad, reproducibilidad y límite de detección de la técnica.

El kit también incluye el marcado molecular o molecular *barcoding* para detectar contaminación cruzada o intercambio de muestras durante el protocolo.

Especificidades técnicas:

- ◇ Tipo de muestra: ADN procedente de sangre periférica.
- ◇ Cantidad de ADN necesario: 200 ng.
- ◇ Cobertura media: > 450X.
- ◇ Cobertura: > 99 % de las regiones cubiertas a > 30X.
- ◇ Uniformidad: > 98 % de cobertura sobre el percentil 20 de la media de cobertura.
- ◇ Especificidad y sensibilidad: > 99 %
- ◇ Repetibilidad y reproducibilidad: > 99 %

04 Advertencias y precauciones

- ◇ Se recomienda seguir estrictamente las instrucciones de este manual, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento de los reactivos.
- ◇ No pipetear con la boca.
- ◇ No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.
- ◇ Se debe proteger debidamente cualquier afección cutánea, así como cortes, abrasiones y otras lesiones de la piel.
- ◇ No verter los restos de reactivos a la red de agua potable. Se recomienda utilizar los contenedores de residuos establecidos por la normativa legal y gestionar su tratamiento a través de un gestor de residuos autorizado.
- ◇ En caso de un derrame accidental de alguno de los reactivos, evitar el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas y limpiar con abundante agua.
- ◇ Las hojas de datos de seguridad (MSDS) de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición.
- ◇ Este producto requiere la manipulación de muestras y materiales de origen humano. Se recomienda considerar todos los materiales de procedencia humana como potencialmente infecciosos y manipularlos conforme a la norma de la OSHA sobre Bioseguridad de nivel 2 de los patógenos de transmisión sanguínea o se deben utilizar otras prácticas pertinentes de bioseguridad para los materiales que contienen o se sospecha que puedan contener agentes infecciosos.
- ◇ Este kit ha sido validado con unos equipos y en unas condiciones específicas que podrían variar sensiblemente en otros laboratorios. Se recomienda por tanto que cada laboratorio realice una validación interna cuando vaya a utilizar por primera vez el kit.
- ◇ El fabricante no responde del mal funcionamiento del ensayo cuando los reactivos incluidos en el kit son sustituidos por otros reactivos no suministrados por Health in Code, S.L.
- ◇ El fabricante no garantiza la reproducibilidad del ensayo cuando el usuario introduce reactivos no validados por Health in Code, S.L., por considerarlos equivalentes a los suministrados en el kit.
- ◇ El fabricante no se hace responsable de los resultados obtenidos cuando el análisis bioinformático se realiza en una plataforma de análisis distinta a **Client Site**.

05

Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

Este kit contiene reactivos suficientes para la preparación de 16 librerías. La relación de reactivos incluidos en el kit es la siguiente:

- **Fragmentation Buffer:** Tampón necesario para la fragmentación del ADN, previa a la preparación de librerías de NGS.
- **Fragmentation Enzyme:** Enzima requerida para la fragmentación del ADN y preparación del ADN para la ligación de los adaptadores.
- **Elution Buffer:** Tampón para eluir el ADN.
- **Reagents Plate:** Placa con todos los reactivos necesarios para llevar a cabo las reacciones de reparación de los extremos de los fragmentos de ADN y ligación de los adaptadores de Illumina, y amplificaciones llevadas a cabo durante el protocolo de preparación de librerías.
- **Beads and Buffers plate:** Placa con las partículas magnéticas y los tampones de lavado necesarios para llevar a cabo la captura y las purificaciones necesarias durante el protocolo de preparación de librerías.
- **Index strip:** Oligonucleótidos con una secuencia única de 8 nucleótidos compatible con los adaptadores de Illumina. Son necesarios para marcar las librerías de cada muestra dando lugar a una combinación única, que permitirá su análisis tras la secuenciación. El kit incluye 16 index diferentes distribuidos en tiras de un solo uso.
- **Cardiovascular Probes Strips:** Oligonucleótidos sintéticos biotinilados complementarios a las regiones diana del kit, que permiten la hibridación con dichas zonas y posteriormente son capturadas mediante partículas magnéticas de estreptavidina, debido a la propiedad biológica de unión entre las moléculas biotina-estreptavidina.
- **Sample Input Strips:** Tiras de 8 pocillos vacías en las que se colocará el ADN de las muestras.
- **Magnis Library Output Strips, QC Strips, and Foil Seals:** Tiras de 8 pocillos para la recogida de las librerías generadas, tiras para la recogida de las librerías precaptura, con las que se podría hacer un control de calidad opcional, y sellos para las tiras de pocillos incluidas en el kit.
- **Magnis 96-Well PCR Plate:** Placa en la que tendrán lugar las reacciones de amplificación.
- **Magnis Deep-Well HSM Plate:** Placa en la que se llevará a cabo la captura y las purificaciones necesarias en el protocolo de preparación de librerías.
- **Magnis Thermal Cycler Seal:** Sello para placa de 96 pocillos.
- **Magnis Tip Waste Bin:** Contenedor para el desecho de las puntas empleadas durante el protocolo.

A continuación, se muestran listados los componentes del kit:

Caja 1 de 4			
Reactivos	Color del soporte	Cantidad	Conservación
Beads and buffer plates	Blanco	2 placas	4°C
Elution Buffer	Disco Verde	2 x 1 mL	4°C

Tabla 1. Reactivos de la caja 1 de Inherited CardioKitDx

Caja 2 de 4			
Reactivos	Color del soporte	Cantidad	Conservación
Fragmentation Buffer	Tapón Verde	32 µL	-20°C
Fragmentation Enzyme	Tapón Blanco	16 µL	-20°C
Reagents Plate	Negro/Blanco	2 placas	-20°C
Index strip*	Negro	2 tiras	-20°C

Tabla 2. Reactivos de la caja 2 de Inherited CardioKitDx

NOTA: Cada kit incluirá 2 de las cuatro posibles combinaciones de Index: A1, A2, A3 y A4.

Caja 3 de 4			
Reactivos	Color del soporte	Cantidad	Conservación
Cardiovascular Probes strips	Blanco	2 tiras	-80°C

Tabla 3. Reactivos de la caja 3 de Inherited CardioKitDx

Caja 4 de 4			
Reactivos	Color del soporte	Cantidad	Conservación
Sample input strips	Rojo	1 tira	15-25°C
Magnis Library Output Strips	Verde	1 tira	15-25°C
QC Strips	Azul	1 tira	15-25°C
Foil Seals	-	5	15-25°C
Magnis 96-Well PCR Plate	Transparente	1 placa	15-25°C
Magnis Deep-Well HSM Plate	Blanco	1 placa	15-25°C
Magnis Thermal Cycler Seal	-	1	15-25°C

Tabla 4. Reactivos de la caja 4 de Inherited CardioKitDx

NOTA: Cada kit incluirá 2 unidades de la Caja 4, una para cada run de 8 muestras con el equipo Magnis.

06 Equipos, reactivos y materiales que no se suministran

Equipos:

- Micropipetas de 10 µL, 20 µL, 200 µL y 1000 µL
- *Vortex* (compatible con tubos de 1.5 mL; con velocidad regulable de 300 a 3000 rpm)
- Centrifuga (compatible con tubos de 1.5 mL, tiras de 0.2mL y placas de 96 pocillos; con velocidad regulable de al menos 1000 rpm)
- Fluorímetro (recomendado: Qubit; Thermo Fisher Scientific)
- Analizador de fragmentos (opcional: *TapeStation System* de Agilent Technologies; *LabChip GX Touch/GXII Touch* de PerkinElmer)
- Equipo automatizado de preparación de librerías *Magnis NGS Prep System*, de Agilent Technologies (cat. no. G9710AA)
- Termociclador con temperatura de la tapa regulable o Sonicador (recomendado: *ME220 Focused-ultrasonicator™*, Covaris)
- Secuenciador de Illumina (recomendado: *NextSeq*)

Reactivos:

- Kit de extracción (recomendado: *QIAamp DNA Investigator Kit*; cat. no. 56504; Qiagen)
- Agua libre de nucleasas
- Reactivos del fluorímetro. Recomendado: *Qubit dsDNA BR Assay kit* (cat. no. Q32853; Invitrogen), *Qubit dsDNA HS Assay kit* (cat. no. Q32854; Invitrogen).
- NaOH 0.2N (cat.no. 1091401000; Fluka)
- TRIS-HCl 200 mM pH 7
- *PhiX Control v3* (cat. no. FC-110-3001; Illumina)
- Reactivos del analizador de fragmentos. Opcional:
 - ◇ *TapeStation D1000 Reagents* (cat. no. 5067-5583; Agilent), *High Sensitivity D1000 Reagents* (cat. no. 5067-5585; Agilent)
 - ◇ *DNA High Sensitivity Reagent Kit* (cat. no. CLS760672; PerkinElmer)

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

Materiales:

- Puntas de pipetas con filtro (10 µL, 20 µL, 200 µL y 1000 µL)
- Puntas estériles con filtro compatibles con *Magnis NGS Prep System* (Ref: 19477-022; Agilent)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Tubos o tiras estériles de 0.2 mL.
- Guantes de látex

- Material fungible del fluorímetro. Recomendado: *Qubit™ assay tubes* (Ref: Q32856; Invitrogen)
- Material fungible del analizador de fragmentos. Opcional:
 - ◇ *TapeStation D1000 ScreenTape* (cat. no. 5067-5582; Agilent), *High Sensitivity D1000 ScreenTape* (cat. no. 5067-5584; Agilent)
 - ◇ *DNA 1K/ 12K/ Hi Sensitivity Assay LabChip* (cat. no. 760517; PerkinElmer)

NOTA

Inherited CardioKitDx está preparado para usarse en combinación con los kits *Imegen-Sample tracking components* (REF: IMG-340), que permiten el seguimiento de cada muestra desde la dilución del ADN hasta el análisis bioinformático de los resultados mediante un sistema integrado de identificación de muestras. De este modo, se puede asegurar la trazabilidad de las muestras durante todo el protocolo. Esta referencia se encuentra disponible bajo petición.

07 Protocolo de ensayo

Los reactivos incluidos en **Inherited CardioKitDx** que serán usados por el equipo automatizado *Magnis NGS Prep System*, se ofrecen pre-dispensados para la realización de las 16 librerías a lo largo de 2 ensayos de 8 librerías cada uno, optimizando así el uso del equipo.

A continuación, se detallan los pasos necesarios para llevar a cabo la preparación de 8 librerías mediante el uso de **Inherited CardioKitDx**.

07.1 | Preparación del instrumento Magnis para ejecutar un protocolo

- 01 Verificar que no haya ningún material de ensayos anteriores sobre la unidad del instrumento, ya que podría interferir en los procesos de puesta en marcha y configuración del instrumento.
- 02 Cerrar la puerta del instrumento.
- 03 Encender el instrumento, presionando el botón de encendido en la parte frontal del dispositivo (se iluminarán los indicadores LED del instrumento). Esperar mientras el sistema realiza una serie de actividades de puesta en marcha, que pueden durar varios minutos.
- 04 Antes de cada ensayo se recomienda realizar una descontaminación UV, para ello:
 - ◇ En la pantalla *Home*, pulsar *Decontamination*.

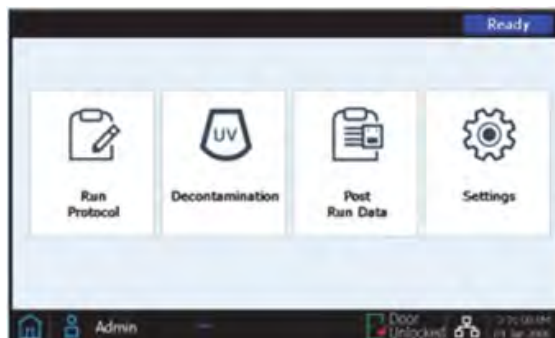


Figura 1. Pantalla Home del sistema Magnis NGS Prep

- ◇ En la pantalla *Decontamination*, presionar *Quick cycle*, seguido de *Start* (los indicadores LED se apagarán durante la descontaminación UV, para dar paso a la emisión UV).

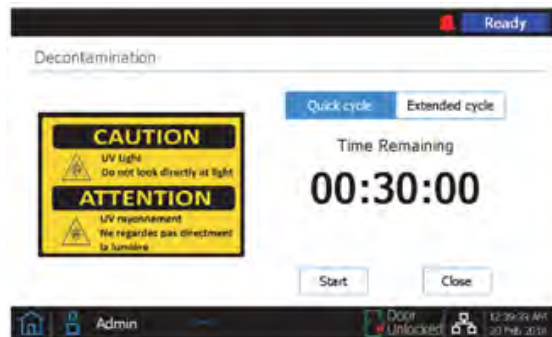


Figura 2. Pantalla Decontamination del sistema Magnis NGS Prep

ADVERTENCIA: No mirar directamente a la luz UV mientras esté activo el proceso de descontaminación.

NOTA: Durante los 30 minutos que dura el proceso de descontaminación, prosiga con el protocolo.

- 05 Una vez completado el ciclo de descontaminación (emisión azul de los indicadores LED del instrumento), pulsar *Close* para volver a la pantalla *Home*.

07.2 | Preparación y fragmentación del ADN molde

A continuación, se detallarán los pasos a seguir para la preparación y fragmentación de 8 muestras, mediante el uso de **Inherited CardioKitDx**.

Todos los reactivos y fungible de preparación, dilución y fragmentación del ADN, deben almacenarse y utilizarse en áreas separadas de aquellas donde se lleven a cabo procedimientos de reacción en cadena de la polimerasa.

07.2.1 | Cuantificación y dilución de las muestras de ADN

- 01 Descongelar a temperatura ambiente las muestras de ADN.
- 02 Agitar y cuantificar las muestras de ADN con un equipo fluorométrico, como Qubit.
- 03 Llevar a cabo un control de calidad del ADN siguiendo uno de los siguientes métodos:
 - ◇ Análisis de la calidad mediante el uso de *Agilent's Genomic DNA ScreenTape*, en combinación con sus reactivos asociados, y siguiendo las instrucciones del proveedor del instrumento y el kit de análisis.
Este análisis permite determinar la integridad del ADN de la muestra y proporciona un número de integridad del ADN (DIN) para cada muestra.
 - ◇ Análisis de la calidad mediante el uso de *LabChip GX Touch/GXII Touch* de PerkinElmer, en combinación con sus reactivos asociados, y siguiendo las instrucciones del proveedor del instrumento y el kit de análisis.
Este análisis permite determinar la integridad del ADN de la muestra y proporciona un valor de calidad (DQS) para cada muestra.

NOTA: Muestras de ADN demasiado degradadas pueden dar lugar a un descenso de la especificidad y la sensibilidad del análisis. Por ello, Health in Code S.L., recomienda el uso de ADNs con calidades superiores a DIN 3 en caso de estar usando TapeStation y DQS 1.5 si se está usando LabChip.

- 04 Diluir cada muestra de ADN a 50ng/μl con agua libre de nucleasas en un volumen final de 25μl.

Opcional: Si se va a utilizar el sistema integrado de trazabilidad de Health in Code S.L., (*Sample Tracking Components*; Ref. IMG-340), realizar este paso, sustituyendo 2.5 µL de agua libre de nucleasas, por la misma cantidad de un único reactivo de seguimiento por cada muestra.

- 05 Agitar en *vortex* y cuantificar de nuevo cada muestra con un equipo fluorimétrico, como Qubit.

07.2.2 | Fragmentación del ADN

A continuación, se especifican dos protocolos de fragmentación del ADN (fragmentación enzimática y fragmentación mecánica), de los cuales habrá que seleccionar sólo uno, en función de los equipos y reactivos disponibles para el usuario.

- ➔ **OPCIÓN A. Fragmentación mecánica:** Requiere el uso de un sonicador (recomendado: *ME220 Focused-ultrasonicator™*; Covaris)

Covaris es un método basado en acústica adaptativa/flexible (AFA) para la sonicación del ADN mediante cavitación isotérmica. La temperatura es un factor tremendamente importante, ya que los pequeños cambios de temperatura afectan al tamaño del ADN generado.

- 01 Diluir cada muestra de ADN con *Elution Buffer* para obtener una concentración de 200 ng totales, en un volumen final de 50µL.
- 02 Agitar todas las diluciones en *vortex*, dar un spin y mantener en frío hasta su uso en el siguiente apartado.
- 03 Colocar el *microTUBE* de 130 µL en el sonicador.
- 04 Con el objetivo de obtener fragmentos de ADN de un tamaño entre 150 y 250 pb, seguir la configuración de la tabla 5 a una temperatura de 2-8 °C.

Configuración	Valor
Tiempo de tratamiento (segundos)	430
Peak Power	50
Duty Factor (%)	20
Ciclos por burst	200
Avg Power	10

Tabla 5. Programa de fragmentación óptimo para Covaris ME220

NOTA: Para el uso de otros instrumentos Covaris consulte las recomendaciones del fabricante para obtener el mismo tamaño de fragmento

- 05 Una vez finalizado el programa, dar un spin al tubo.
- 06 Transferir inmediatamente todo el volumen de cada *microTUBE* de 130 µL a su correspondiente pocillo de una *Sample Input Strip*, sellar con los sellos de aluminio incluidos, y mantener en frío hasta su uso en el siguiente apartado

NOTA: En el equipo *Magnis NGS Prep System* la muestra se debe situar como se observa en la Figura 3, con la Muestra 1 cargada en el pocillo más alejado del código de barras.

NOTA: No agregue ningún texto o etiqueta que pueda oscurecer el código de barras de la *Sample Input Strip*.

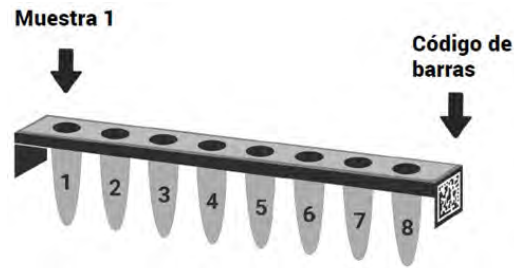


Figura 3. Orientación requerida de las muestras en la Sample Input Strip

- 07 **Opcional:** Health in Code, S.L. recomienda comprobar el tamaño de las librerías obtenidas empleando *Tapestation System* y los kits comerciales *High Sensitivity D1000 Reagents* (cat. no. 5067-5585) y *High Sensitivity D1000 ScreenTape* (cat. no. 5067-5584) de Agilent Technologies. Tras el análisis de las muestras, el tamaño esperado de la librería es aproximadamente de 150-250 pb. En caso de obtener un tamaño no esperado revise el protocolo o póngase en contacto con el soporte técnico de Health in Code, S.L.

- **OPCIÓN B. Fragmentación enzimática:** Termociclador con tapa con temperatura regulable.

En este apartado, el ADN se fragmentará enzimáticamente, con el objetivo de obtener fragmentos de ADN de un tamaño entre 100 y 150 pb.

Reactivos a utilizar en este apartado: este apartado:

Reactivo	Color	Conservación
Fragmentation Buffer	Tapón verde	-20°C
Fragmentation Enzyme	Tapón blanco	-20°C

- 01 Descongelar y mantener en frío el reactivo *Fragmentation Buffer*. Mantener a -20°C el reactivo *Fragmentation Enzyme* hasta su uso.
- 02 Diluir cada muestra de ADN con agua libre de nucleasas para obtener una concentración de 200 ng totales, en un volumen final de 7µl, en una tira de pocillos de 0.2mL

En caso de no disponer de 50 ng totales en un volumen de 7 µL, escoger una de las siguientes opciones:

- ↘ Duplicar el volumen final, duplicando también el del resto de reactivos empleados en la fragmentación.
- ↘ Bajar la concentración total a 10 ng totales. Si se elige esta opción se recomienda llevarlo a cabo únicamente para las muestras que no alcancen los 50 ng totales, y agrupar todas las muestras con estas características en un mismo run. De lo contrario, configurar el equipo Magnis con el programa recomendado para la muestra con menor *input*.

⚠ IMPORTANTE

Ambas opciones tienen desventajas que deben valorarse previamente antes de elegir una de ellas. Duplicar el volumen final implica el consumo de más reactivos de los incluidos en el kit, por lo que se requerirán

reactivos de fragmentación adicionales. Bajar la concentración de partida implicará un aumento en los duplicados de secuenciación y un descenso de las métricas de cobertura, que pueden llegar a influir en la sensibilidad y especificidad de la técnica.

- 03 Agitar todas las diluciones en *vortex*, dar un *spin* y mantener en frío hasta su uso.
- 04 Preparar el volumen apropiado del *mix* de fragmentación en frío, tal y como se describe a continuación, agitando cada reactivo antes de su uso. El reactivo *Fragmentation Buffer* debe agitarse vigorosamente en *vortex*, mientras que el reactivo *Fragmentation Enzyme* se agita varias veces por inversión. En el procesado de varias muestras, recomendamos preparar las mezclas de reactivos con un exceso del 12%.

Reactivo	Volumen por reacción	Volumen (8 muestras)
Fragmentation Buffer	2 µL	18 µL
Fragmentation Enzyme	1 µL	9 µL

- 05 Agitar vigorosamente en *vortex*.
- 06 Dispensar 3 µL del *mix* de fragmentación a cada pocillo de 0.2 mL con la muestra fragmentada. Mezclar pipeteando 20 veces.
- 07 Sellar la tira, dar un *spin* a las muestras, inmediatamente después colocar los tubos en el termociclador y ejecutar el programa de fragmentación.
 - ◇ Tapa pre-calentada a 100 °C.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
37°C	15 minutos	1
65°C	5 minutos	1
4°C	∞	

Tabla 6. Programa de fragmentación óptimo

NOTA: Este protocolo, requiere que la tapa esté pre-calentada a 100 °C. En termocicladores con rampas rápidas como el usado durante la validación de este protocolo, *GeneAmp PCR System 9700* (Thermo Fisher Scientific), no es necesario pre-calentar la tapa. Si este no es su caso, pre-caliente la tapa unos minutos antes de comenzar con el protocolo.

- 08 Cuando acabe el programa de fragmentación, extraer las muestras del equipo, dar un *spin*, añadir agua libre de nucleasas a cada muestra hasta un volumen total de 50 µL, transferir todo el volumen a una *Sample Input Strip*, sellar con los sellos de aluminio incluidos, y mantener en frío hasta su uso en el siguiente apartado.

NOTA: En el equipo *Magnis NGS Prep System* la muestra se debe situar como se observa en la Figura 3, con la Muestra 1 cargada en el pocillo más alejado del código de barras.

NOTA: No agregue ningún texto o etiqueta que pueda oscurecer el código de barras de la *Sample Input Strip*.

07.3 | Preparación de los reactivos y fungible empleado en el sistema Magnis

Reactivos a utilizar en este apartado:

Reactivo	Color	Conservación
Reagents Plate	Placa azul	-20°C
Beads and Buffer Plate	Placa blanca	4°C
Index Strip	Tira negra	-20°C
Cardiovascular Probe Strip	Tira blanca	-80°C
Caja 4	N/A	15-25°C

01 Preparación del reactivo *Reagents Plate*:

- ◇ Descongelar a temperatura ambiente la placa, manteniendo su embalaje de cartón blanco.
- ◇ Una vez descongelado el contenido de todos los pocillos, agitar en *vortex* la placa sosteniendo la placa con su embalaje de cartón, comenzar presionando sobre el lado largo de la placa contra el cabezal del *vortex*, durante 10 segundos. Posteriormente, girar la placa 90° y presionar el lado corto de la placa contra el cabezal del *vortex* otros 10 segundos. Continuar la secuencia de rotación y agitación en los cuatro lados de la placa.
- ◇ Centrifugar la placa envuelta en cartón a 250 x g durante 1 minuto.
- ◇ Comprobar que no haya burbujas al fondo de los pocillos de la placa. Si hubiera, repetir la centrifugación.
- ◇ Conservar la placa, manteniendo su embalaje, en frío para su uso el mismo día.

02 Preparación del reactivo *Beads and Buffer plate*:

- ◇ Atemperar durante al menos 30 minutos antes de su uso, manteniendo su embalaje de cartón blanco.
- ◇ Agitar en *vortex* la placa sosteniendo la placa con su embalaje de cartón. Comenzar presionando sobre el lado largo de la placa contra el cabezal del *vortex*, durante 10 segundos. Posteriormente, girar la placa 90° y presionar el lado corto de la placa contra el cabezal del *vortex* otros 10 segundos. Continuar la secuencia de rotación y agitación en los cuatro lados de la placa.
- ◇ Centrifugar la placa envuelta en cartón a 150 x g durante 10 segundos. No exceder la velocidad y duración de centrifugado recomendadas, para evitar que se sedimenten las partículas magnéticas.
- ◇ Mantener la placa, manteniendo su embalaje, a temperatura ambiente para su uso el mismo día.

03 Preparación del reactivo *Index strip*:

- ◇ Determinar y registrar el conjunto de *index* que se utilizará en el ensayo. Las tiras suministradas tienen grabado en el extremo opuesto al *barcode*, la combinación que incluyen, A1, A2, A3 o A4. En la siguiente tabla se puede observar el orden de los *index* en cada tira, y su secuencia.

A1 Strip		A2 Strip		A3 Strip		A4 Strip	
Index	Secuencia	Index	Secuencia	Index	Secuencia	Index	Secuencia
A01	GTCTGTCA	A02	GCGAGTAA	A03	AGCAGGAA	A04	CCGTGAGA
B01	TGAAGAGA	B02	GTCGTAGA	B03	AGCCATGC	B04	GACTAGTA
C01	TTCACGCA	C02	GTGTTCTA	C03	TGGCTTCA	C04	GATAGACA
D01	AACGTGAT	D02	TATCAGCA	D03	CATCAAGT	D04	GCTCGGTA
E01	ACCACTGT	E02	TGGAACAA	E03	CTAAGGTC	E04	GGTGCGAA
F01	ACCTCCAA	F02	TGGTGGTA	F03	AGTGGTCA	F04	AACAACCA
G01	ATTGAGGA	G02	ACTATGCA	G03	AGATCGCA	G04	CGGATTGC
H01	ACACAGAA	H02	CCTAATCC	H03	ATCCTGTA	H04	AGTCACTA

Tabla 7. Secuencias de los index incluidos en el kit

- ◇ Descongelar en frío la *Index strip* seleccionada, agitar 5 segundos en *vortex* y dar un spin.
- ◇ Revisar los pocillos de la tira para verificar que el líquido se acumula en el fondo de los pocillos y que no haya burbujas.

IMPORTANTE: En caso de no registrar la tira de *index* empleada para un ensayo, esta puede ser revisada a través del equipo *Magnis Prep System* en la pantalla *Post-Run Data*. Una vez en esta pantalla, abrir la pestaña *Labware Info* y buscar la fila *Index Strip*. El número de la tira se informa como un valor de 1 a 12 en la parte derecha de la pantalla, en la columna *Index Strip*. Los *Index* específicos asociados con cada número de 1 a 12 se muestran en la siguiente tabla.

N° de <i>Index Strip</i> de la pantalla <i>Post-Run Data</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Inscripción de la <i>Index Strip</i>	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4

Tabla 8. Correlación de los Index entre la pantalla *Post-Run Data* y la inscripción en la tira

- 04 Inmediatamente antes de su uso, descongelar en frío la *Cardiovascular Probe Strip*. Agitar 5 segundos en *vortex* y dar un spin. Es importante revisar que no se hayan formado burbujas en el fondo del pocillo.

NOTA: La sonda se encuentra pre-dispensada en el primer pocillo de la tira, la cual no incluye etiquetas legibles que muestren la identidad específica del diseño de la sonda. Se recomienda tener especial cuidado para garantizar la trazabilidad de este reactivo tanto en el almacenaje como durante el protocolo.

- 05 Por último, preparar una unidad de la Caja 4 para utilizarla durante la configuración de la unidad.

07.4 | Ejecución del protocolo de preparación de las librerías

07.4.1 | Inicio del protocolo

- 01 En la pantalla Home de la pantalla táctil, pulsar “Run Protocol”. El sistema bloqueará la puerta del instrumento y realizará un *Instrument Health Check* (IHC), que puede durar varios minutos.
- 02 Una vez acabado el chequeo aparecerá directamente la pantalla *Enter Run Info* (introducir la información del ensayo). En el menú *Protocol*, seleccionar *SSEL XTHS-RevB-ILM*.
- 03 **Recomendado:** marcar la casilla de verificación *Aliquot sample for QC* para que el equipo recoja una alícuota de cada librería pre-captura, y poder analizar su control de calidad posteriormente.

NOTA: El control de calidad de las librerías pre-captura sólo estará disponible cuando el ensayo completo haya finalizado.



Figura 4. Pantalla *Enter Run Info* del sistema *Magnis NGS Prep*

- 04 Avanzar a la siguiente pantalla.
- 05 Seleccionar el tipo de muestra apropiado, *High Quality DNA*.
- 06 Seleccionar la cantidad de ADN de partida en el menú *Input Amount*. Aunque aparecen las opciones 10 ng, 50 ng, 100 ng y 200 ng, para la preparación de librerías mediante el uso de *Inherited CardioKitDx*, se recomienda la cantidad de 200 ng.

NOTA: Los ajustes de calidad y cantidad de ADN molde determinarán el número de ciclos en las posteriores amplificaciones que llevará a cabo el equipo. Por lo que es importante introducir esta información adecuadamente, así como que todas las muestras tengan idéntica cantidad de ADN de entrada.

07.4.2 | Configuración de la unidad

La configuración de la unidad puede llevarse a cabo fácilmente a través de los pasos indicados en la pantalla táctil de *Magnis*.

Para cada paso de carga de la unidad, la posición que debe cargarse aparecerá sombreada en azul en la pantalla táctil. Una vez completado cada paso, avanzar a la siguiente pantalla.

Para garantizar la correcta colocación de los reactivos y material fungible en la unidad Magnis, comprobar que el *barcode* de cada elemento está orientado hacia el usuario, es decir hacia la parte delantera del instrumento. Con excepción de *Magnis Thermal Cyclers Seal*, cuyo *barcode* va orientado hacia arriba y las 3 cajas de puntas necesarias y no incluidas en el kit, que no llevan *barcode*.

Es importante que, tras retirar la tapa de las cajas de puntas nuevas y completamente llenas, se verifique que las cajas estén bien fijadas en la plataforma.

La siguiente figura muestra una unidad totalmente cargada, numerándose cada material del 1 al 10, siguiendo los pasos que solicita el equipo Magnis. Como puede observarse las dos placas de reactivos, así como las cinco tiras necesarias, deben introducirse en el equipo selladas.



Figura 5. Unidad del instrumento Magnis NGS Prep cargada para el ensayo y guía rápida de carga

A continuación, se detallan los pasos de configuración que se indican en la pantalla táctil de Magnis:

- 01 Colocar el recipiente desechable *Magnis Tip Waste Bin* (incluido en la Caja 4) en el cajón de desechos situado en la esquina inferior izquierda. El *barcode* debe quedar orientado hacia el usuario, como se muestra en la pantalla táctil. Cerrar el cajón de desechos.

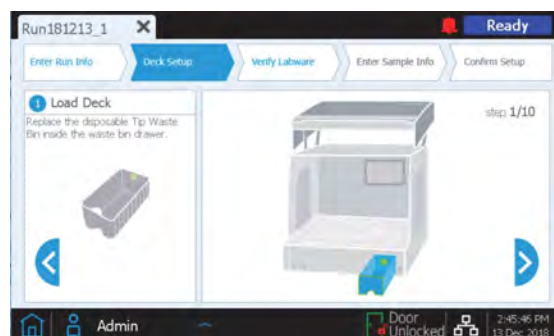


Figura 6. Paso 1 de 10 de la pantalla Deck Setup del equipo Magnis NGS Prep

- 02 Colocar la *Magnis Deep-Well HSM Plate* (incluida en la Caja 4) tal y como muestra la pantalla táctil del equipo. Para ello, primero se debe insertar el borde izquierdo de la placa en la ranura con resorte y, a continuación, bajar el borde derecho de la placa hasta que se alinee con la plataforma. Una vez alineada, mover la placa ligeramente hacia la derecha, y asegurarse de que queda bien fija dentro del soporte.

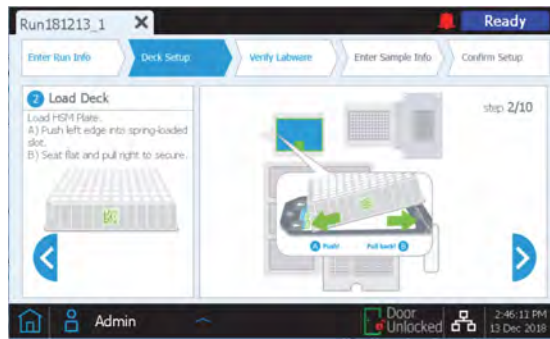


Figura 7. Paso 2 de 10 de la pantalla Deck Setup del equipo Magnis NGS Prep

- 03 Colocar el *Magnis Thermal Cycler Seal* (incluido en la Caja 4) tal y como muestra la pantalla táctil del equipo. Para ello, retirar la película protectora de la almohadilla blanca situada bajo la placa de metal. Después de retirar toda la lámina de película, insertar el *Thermal Cycler Seal* en la ranura del termociclador, con el *barcode* hacia arriba, y deslizar hasta que se encaje en su lugar.

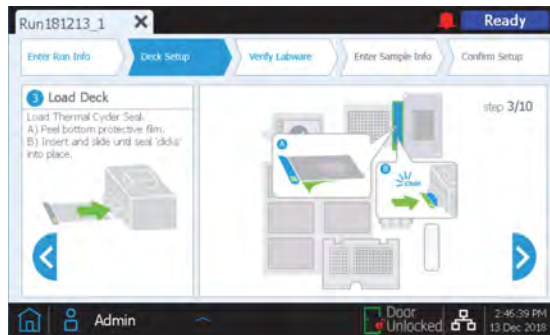


Figura 8. Paso 3 de 10 de la pantalla Deck Setup del equipo Magnis NGS Prep

- 04 Colocar la *Magnis 96-Well PCR Plate* (incluida en la Caja 4) tal y como muestra la pantalla táctil del equipo. Para ello, inserte los pocillos de la placa en los pocillos del bloque del termociclador, con el *barcode* de la placa orientado hacia el usuario. Asegurar la fijación de la placa presionando uniformemente primero en el centro de la placa y posteriormente en las esquinas de la placa.



Figura 9. Paso 4 de 10 de la pantalla Deck Setup del equipo Magnis NGS Prep

- 05 Cargar una caja de puntas nueva y llena en cada una de las posiciones de la unidad indicadas en la pantalla táctil del equipo (tres cajas en total). Después de retirar la tapa, verificar que cada caja de puntas queda bien fija a su plataforma.

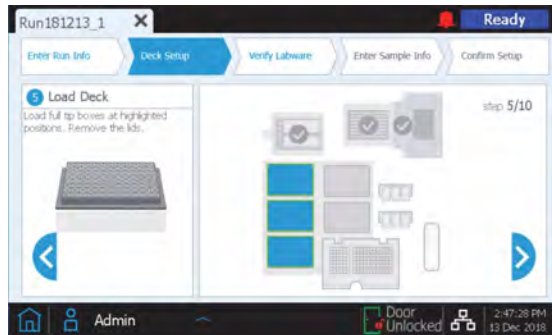


Figura 10. Paso 5 de 10 de la pantalla Deck Setup del equipo Magnis NGS Prep

- 06 Colocar la *Beads and Buffer Plate* (preparada en el apartado 7.3 de este documento). Retirar la caja de cartón blanca y, a continuación, colocar la placa tal y como se muestra en la pantalla táctil del equipo, con el *barcode* orientado hacia el usuario. Para ello, primero se debe insertar el borde izquierdo de la placa en la ranura con resorte, a continuación, bajar el borde derecho de la placa hasta que se alinee con la plataforma. Una vez alineada, mover la placa ligeramente hacia la derecha, y asegurarse de que queda bien fija dentro del soporte.



Figura 11. Paso 6 de 10 de la pantalla Deck Setup del equipo Magnis NGS Prep

- 07 Antes de proseguir con la carga del equipo Magnis, el módulo de enfriamiento del instrumento debe alcanzar la temperatura de 12°C. Si no se ha alcanzado dicha temperatura al llegar a este paso, la pantalla táctil aparecerá como se muestra en la Figura 12. Sin embargo, si el enfriador ya ha alcanzado la temperatura necesaria no aparecerá esta pantalla.

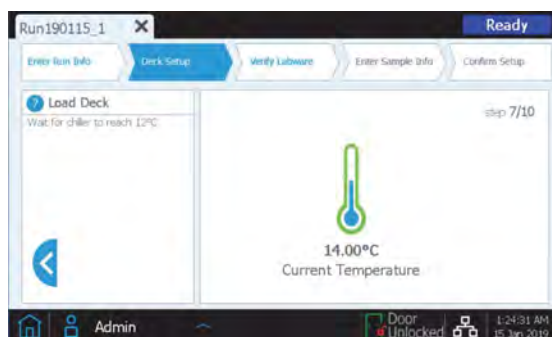


Figura 12. Paso 7 de 10 de la pantalla Deck Setup del equipo Magnis NGS Prep

- 08 Abrir la puerta del módulo enfriador, pulsando el botón de medio círculo indicado con una flecha verde en la pantalla táctil. Colocar la *Reagent Plate* (preparada en el apartado 7.3 de este documento) en el módulo de enfriamiento. Retirar la caja

de cartón blanca y, a continuación, cargar la placa tal y como se muestra en la pantalla táctil del equipo, con el *barcode* orientado hacia el usuario. Presionar firmemente hacia abajo, aplicando presión uniformemente a lo largo de la placa.

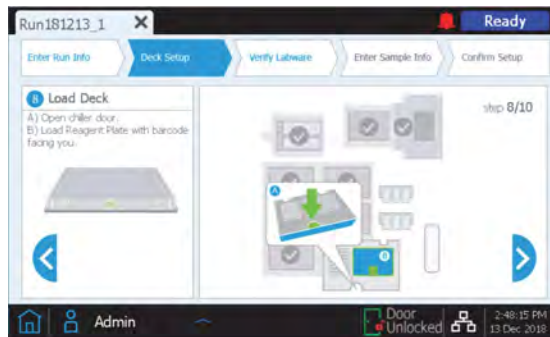


Figura 13. Paso 8 de 10 de la pantalla Deck Setup del equipo Magnis NGS Prep

- 09 Cargar las tiras de tubos para el ensayo en las posiciones indicadas del enfriador como se muestra en la pantalla táctil del equipo. Fijar cada tira presionado firme y uniformemente sobre los bordes de la tira de tubos. Evitar tocar o dañar los sellos de aluminio. Todas las tiras de tubos deben tener el *barcode* orientado hacia el usuario.
- ◇ Cargar la *Sample Input Strip* (tira roja), con las muestras de ADN preparadas en el apartado 7.2 de este documento, en la posición S del soporte de frío del equipo.
 - ◇ Cargar la *Index Strip* (tira negra), preparada en el apartado 7.3 de este documento, en la posición IDX del soporte de frío del equipo.
 - ◇ Cargar la *Cardiovascular Probe Strip* (tira blanca), preparada en el apartado 7.3 de este documento, en la posición P del soporte de frío del equipo.
 - ◇ Cargar la *Magnis Library Output Strip* (tira verde), incluida en la Caja 4, en la posición L del soporte de frío del equipo.
 - ◇ **Opcional:** Si el ensayo incluirá una recolección de alícuotas de las librerías pre-captura para su control de calidad, como recomienda Health in Code, S.L., cargar la *QC Strip* (tira azul), incluida en la Caja 4", en la posición Q del soporte de frío del equipo.

Una vez cargadas todas las tiras, cerrar la puerta del enfriador.



Figura 14. Paso 9 de 10 de la pantalla Deck Setup del equipo Magnis NGS Prep

10 Cerrar la puerta del instrumento.



Figura 15. Paso 10 de 10 de la pantalla Deck Setup del equipo Magnis NGS Prep

07.4.3 | Verificación del material de laboratorio

Una vez concluida la carga del equipo, se realiza la fase *Verify Labware*, en la que el equipo escanea el *barcode* de cada uno de los componentes presentes en la unidad.

Antes de iniciar la verificación automatizada, se debe comprobar que se hayan retirado las tapas de todas las cajas de puntas y que todas estén llenas, tal y como indica la siguiente figura. Una vez se haya verificado, presionar OK para iniciar la verificación del material.

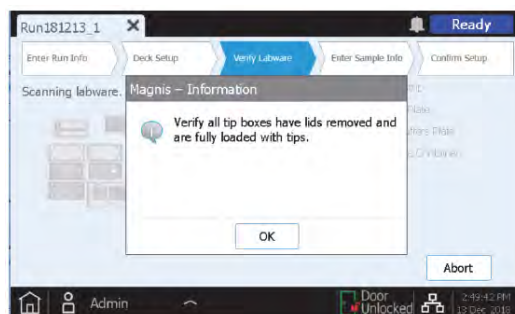


Figura 16. Ventana emergente de la pantalla Verify Labware del equipo Magnis NGS Prep

Durante la verificación del material, el instrumento verificará que todos los componentes necesarios para el ensayo están presentes, en la posición y orientación correctas, así como que no hayan excedido su caducidad.

Los resultados de la verificación se mostrarán en la pantalla táctil de Magnis, si todo es correcto (Figura 17), avanzar a la siguiente pantalla, en caso contrario consulte el apartado 9 de este documento.

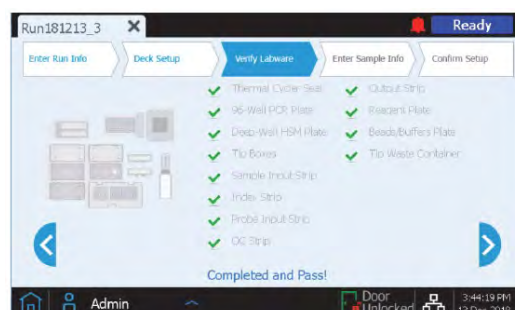


Figura 17. Pantalla Verify Labware del equipo Magnis NGS Prep, tras una verificación correcta del material

La pantalla final de *Verify Labware* permite revisar los detalles de la sonda. Avanzar a la siguiente pantalla.

07.4.4 | Asignación de la información de la muestra

El *software* Magnis asigna automáticamente un *Sample ID* predeterminado para la posición de cada muestra, que pueden ser remplazados con un nombre de muestra elegido por el usuario siguiendo cualquiera de los dos métodos que se indican:

01 Asignación manual de las muestras:

- ◇ En la pantalla *Enter Sample Info*, seleccionar una posición concreta de la muestra en la pantalla táctil.
- ◇ Utilizar la herramienta *Edit Sample ID* para introducir el texto deseado.
- ◇ Pulsar *Change* para guardar el texto introducido para la posición de muestra seleccionada.

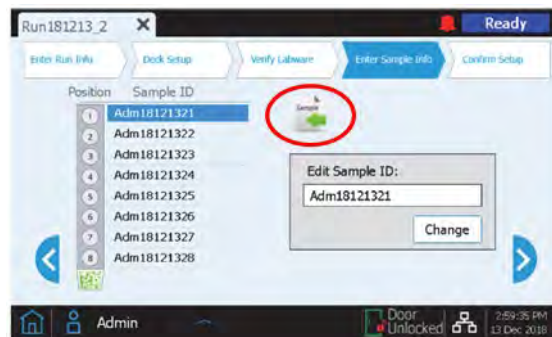


Figura 18. Pantalla *Edit Sample Info* del equipo Magnis NGS Prep, destacando con una circunferencia el botón de carga de muestras.

02 Importación de asignaciones de muestras utilizando un archivo.csv:

- ◇ Crear un archivo.csv (valor separado por comas) que contenga los nombres de las muestras ordenadas. Para la introducción del nombre de la muestra puede usarse el *software* Microsoft Excel, y posteriormente guardarse en formato .csv.
- ◇ Introducir el texto de cabecera `sample_id` en la celda A1, como muestra la Figura 19.

	A
1	sample_id
2	HD18060701
3	HD18060702
4	HD18060703
5	HD18060704
6	HD18060705
7	HD18060706
8	empty1
9	empty2

Figura 19. Ejemplo de contenido de archivo.csv (mostrado en formato de hoja de cálculo) para cargar asignaciones de muestras.

- ◇ Introducir el nombre de cada muestra desde la celda A2 a la A9. El archivo de entrada de la muestra debe contener 8 ID de muestra únicos. Si se va a llevar a cabo el protocolo con menos de 8 muestras, debe rellenar esas posiciones en el archivo, como muestra la Figura 19 (empty1 y empty2).

- ◇ Guardar el archivo en formato .csv.
- ◇ Descargar el archivo .csv en un disco USB no cifrado, e introducir dicho USB en uno de los puertos del equipo Magnis.
- ◇ Al configurar el ensayo, en la pantalla *Enter Sample Info*, pulsar el botón de carga de muestras (destacado con una circunferencia en la Figura 18).
- ◇ Seguir las instrucciones del asistente de configuración del protocolo para transferir los ID de las muestras desde el disco USB.

07.4.5 | Confirmación de la configuración e inicio del ensayo

- 01 Verificar las características generales del ensayo. Una vez se confirme que todo es correcto, presionar la flecha hacia adelante para pasar a la pantalla de configuración final.
- 02 Verificar los detalles del ensayo relacionados con las características de la muestra de ADN. Tras confirmar que los detalles de la configuración son correctos, pulsar el botón *Start* para comenzar el ensayo. ▶

IMPORTANTE: Los números de ciclos de las PCRs pre y post captura han sido fijados en función de la calidad y cantidad de ADN. Variarlos afectaría a la sensibilidad, especificidad y LOD de Inherited CardioKitDx.

Una vez se inicie el ensayo, el indicador LED se iluminará en color verde y la pantalla táctil mostrará el estado del ensayo, así como una estimación del tiempo restante antes de que finalice el ensayo.

El protocolo SSEL XTHS-RevB-ILM dura 9 horas aproximadamente, y puede funcionar *overnight* para mayor comodidad. Una vez finalizado el protocolo, las librerías preparadas se conservarán automáticamente a 12 °C. Recoger las librerías del instrumento en un plazo máximo de 24 horas.

Si es necesario, el ensayo se puede abortar pulsando el cuadrado rojo de *Stop* de la pantalla *Running*. Se abrirá un mensaje de advertencia que le pide confirmar que desea abortar el ensayo. Una vez se detiene un ensayo, no se puede reanudar, y el material de laboratorio utilizado en él no se puede volver a cargar para un ensayo posterior.

La pantalla *Running* debe permanecer abierta durante todo el ensayo y el botón de cierre de pantalla (x) y otros botones de navegación estarán inactivos mientras el ensayo esté en curso. No se puede utilizar la pantalla táctil para realizar otras funciones durante un ensayo.

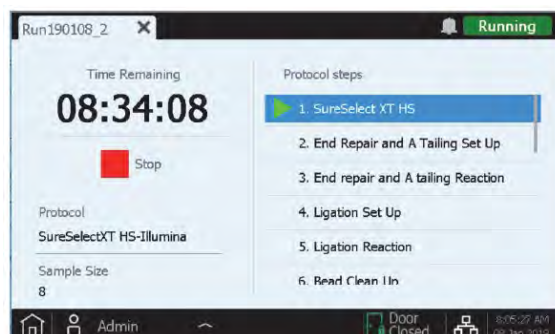


Figura 20. Pantalla *Running* durante un ensayo

07.4.6 | Recogida de librerías del equipo

Una vez finalizado el ensayo, la pantalla táctil se muestra como aparece en la siguiente figura. Pulsando *OK*, el equipo transfiere las librerías desde el termociclador, donde se han mantenido desde la finalización del protocolo a la *Library Output Strip* verde, situada en el módulo de enfriamiento.

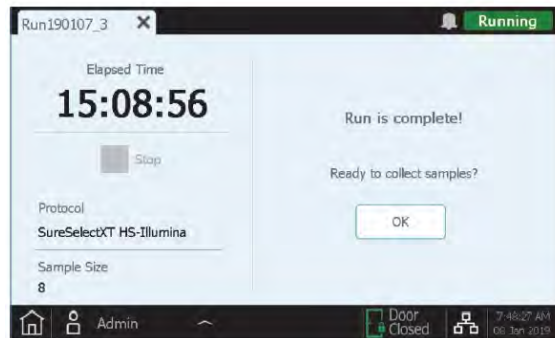


Figura 21. Pantalla Running tras un ensayo

Antes de abrir la puerta del equipo, esperar a que los indicadores LED se pongan azules, indicador de que todos los pasos de procesamiento de la muestra mediada por el equipo han acabado.

El módulo de enfriamiento se mantendrá a 12°C durante un máximo de 2 horas desde que las librerías son colocadas en la *Library Output Strip* verde, siempre y cuando la puerta del equipo se mantenga cerrada.

Abrir la puerta del equipo (hasta que el indicador LED se ilumine de color blanco), recoger y sellar las librerías de la *Library Output Strip* verde.

↙ Es posible detener el protocolo en este punto conservando las librerías a 4°C si van a ser usadas en las próximas 12 horas o a -20°C para almacenamientos más prolongados.

Si se recolectaron las muestras opcionales para el control de calidad de las bibliotecas pre-captura del ensayo, retirar la *QC Strip* azul del módulo de enfriamiento y dejar secar a temperatura ambiente sin sellar si se va a continuar con el protocolo en las próximas 24 horas, o selladas para almacenamientos más prolongados.

Una vez abierta la puerta para la recolección de las librerías, la pantalla táctil del equipo aparecerá como se muestra a continuación:

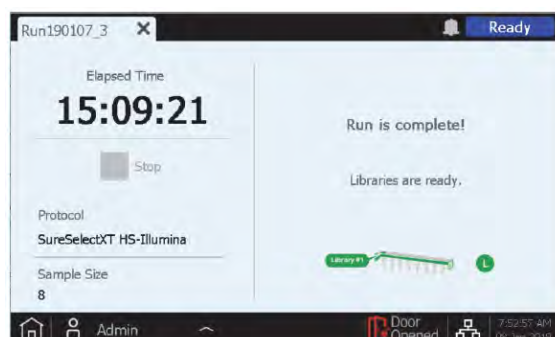


Figura 22. Pantalla Running tras un ensayo y con las librerías ya recogidas

Para cerrar la pantalla del ensayo y volver a la pantalla Home, pulsar X en la pestaña. Este paso puede llevar varios segundos.

07.5 | Limpieza del equipo después de un ensayo

Retirar y desechar todos los consumibles usados que queden en la unidad del instrumento:

- + El recipiente desechable con las puntas usadas a lo largo del ensayo.
- + La *Magnis Deep-Well HSM*.
- + La *Magnis Thermal Cycler Seal*.
- + La *Magnis 96-Well PCR Plate*.
- + Todas las cajas de puntas, incluidas las parcialmente llenas.
- + La *Beads and Buffer Plate*.
- + La *Reagent Plate*.
- + Las tiras rojas, negras y blancas empleadas durante el ensayo.

Si se observan derrames o fugas de materiales en la unidad del instrumento, se recomienda seguir el procedimiento de descontaminación UV de *Extended Cycle*. Limpiar el derrame siguiendo las instrucciones proporcionadas en la Guía del usuario del instrumento.

07.6 | Validación y cuantificación de las librerías

07.6.1 | Control de calidad opcional de la librería pre-captura

Si se requiere el análisis de las librerías pre-captura, resuspender las librerías secas en 6 μL de agua libre de nucleasas para obtener una concentración adecuada para el análisis, mediante el uso recomendado de *TapeStation System* y los kits comerciales *D1000 Reagents* (cat. no. 5067-5583) y *D1000 ScreenTape* (cat. no. 5067-5582) de Agilent Technologies.

Tras la adición de los 6 μL de agua libre de nucleasas, incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Por último, agitar vigorosamente en *vortex* para asegurar la resuspensión completa.

Tras el análisis de las muestras con *TapeStation* se debe obtener un tamaño de la librería entre 260-320 pb (Figura 23). En caso de obtener un tamaño no esperado revise el protocolo o póngase en contacto con el soporte técnico de Health in Code, S.L.

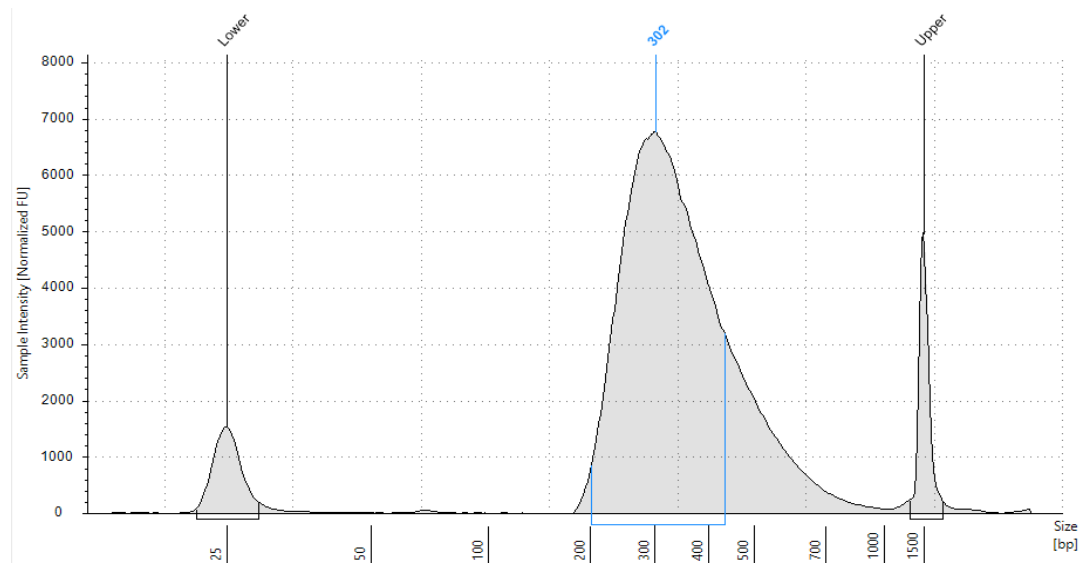


Figura 23. Resultado esperado tras el análisis de tamaño de las librerías pre-captura con TapeStation System

Para determinar la concentración de ADN, se deberá integrar el área del pico correspondiente con el tamaño de librería esperado. La cantidad de ADN de librería obtenido variará en función de la concentración del ADN de partida, variando de 30 a 160 ng/μL. El rendimiento general de la librería pre-captura puede calcularse como la cantidad de ADN en 1 μL de la muestra del control de calidad reconstituida x 36 (este valor incluye los ajustes de dilución).

07.6.2 | Control de calidad de la librería post-captura

Antes de agrupar las librerías para la secuenciación multiplexada, es necesario analizar la cantidad y calidad de cada una de ellas.

Para medir la concentración del ADN, se recomienda el uso de un fluorímetro Qubit® 2.0, el kit comercial *Qubit ds DNA HS Assay kit* (cat. no. Q32854) y los tubos *Qubit™ assay tubes* (cat. no. Q32856) de Invitrogen.

La concentración de las librerías post-captura oscilará entre 2 y 10 ng/μL.

Para el análisis de calidad de los fragmentos capturados, Health in Code, S.L. recomienda el uso de *TapeStation System* y los kits comerciales *High Sensitivity D1000 Reagents* (cat. no. 5067-5585) y *High Sensitivity D1000 ScreenTape* (cat. no. 5067-5584) de Agilent Technologies.

El tamaño medio esperado de los fragmentos se sitúa entre 250 y 350 pb. En caso de obtener un tamaño no esperado, revise el protocolo, así como el análisis de calidad de las librerías pre-captura, lea detenidamente el apartado 9 o póngase en contacto con el soporte técnico de Health in Code, S.L.

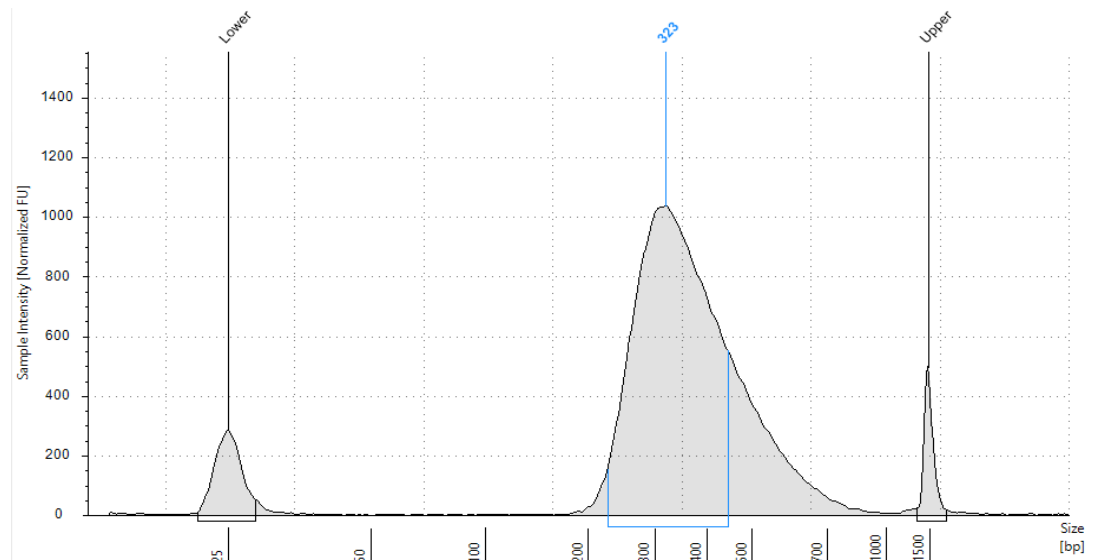


Figura 24. Resultado esperado tras el análisis de tamaño de las librerías post-captura con TapeStation System

Con los datos de concentración del ADN y el tamaño del pico de las librerías se obtiene la concentración de estas, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración librerías (nM)} = \left[\text{Concentración (ng/}\mu\text{L)} \cdot \frac{1500}{\text{Tamaño (pb)}} \right]$$

Por último, diluir cada librería a 4 nM con el reactivo *Elution Buffer* y hacer un *pool equimolar* de todas las librerías que se vayan a incluir en un run.

↙ Es posible detener el protocolo en este punto conservando las librerías a 4°C si van a ser usadas en las próximas 24 horas o a -20°C para almacenamientos más prolongados.

07.7 | Desnaturalización de las librerías para carga en el equipo Illumina NextSeq 500/550

A continuación, se debe llevar a cabo el protocolo de desnaturalización previa a la carga en un secuenciador Illumina *NextSeq 500/550* siguiendo los siguientes pasos:

- 01 Descongelar el reactivo HT1 (incluido en el kit de reactivos de Illumina con el que se vaya a llevar a cabo la secuenciación) y mantener en frío hasta su uso.
- 02 Descongelar *PhiX control* y mantener en frío hasta su uso.

IMPORTANTE: el *PhiX Control* debe estar desnaturalizado y diluido a 20 pM, lo que supone un 1% de *PhiX* en la reacción. Para la desnaturalización de *PhiX Control*, seguir el protocolo de desnaturalización de *PhiX Control v3* de cada equipo, proporcionado por Illumina.

- 03 Añadir 5 μL del *pool* de librerías, diluido previamente a 4 nM, a un tubo de 1.5 mL y 5 μL de NaOH 0.2N. Agitar en *vortex* y dar un spin.
- 04 Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 05 Añadir 5 μL de Tris-HCl 200 mM pH 7. Agitar en *vortex* y dar un spin.

- 06 Añadir 985 µL de HT1 y agitar en *vortex*. En este momento la librería está a 20 pM.
- 07 Transferir 78 µL de la librería a 20 pM a un tubo nuevo de 1.5 mL.
- 08 Añadir 1222 µL de HT1.
- 09 A esta mezcla, añadir 1.2 µL de *PhiX control* desnaturalizado y diluido a 20 pM.
En este momento la librería quedará diluida a 1.2 pM.
- 10 Cargar todo el volumen que contiene el tubo de 1.5 mL en el cartucho.

En la siguiente tabla se especifica el número de muestras máximo recomendado por run, en función del kit de secuenciación empleado, para garantizar un número mínimo de *clusters* PF de aproximadamente 6,5 millones por muestra:

NextSeq Reagents Kit	Nº máximo de muestras
NextSeq 500/550 Mid Output v2.5 kit (150 cycles). Ref: 20024904	16
NextSeq 500/550 High Output v2.5 kit (150 cycles). Ref: 20024907	32

Tabla 9. Kit de NextSeq Illumina y número máximo de muestras a analizar con Inherited CardioKitDx

07.8 | Configuración de la plataforma NextSeq

- ◇ *Read Type: Paired End.*
- ◇ *Cycles:*
 - ↳ *Read 1: 75*
 - ↳ *Read 2: 75*
 - ↳ *Index 1 (i7): 8*

08 Análisis de los resultados

El análisis bioinformático de los resultados se realiza mediante una *pipeline* de análisis diseñada especialmente para **Inherited CardioKitDx**, a través de la plataforma **Health in Code Client Site**. El acceso a esta herramienta se realiza a través de: www.clientsite.healthincode.com.

La *pipeline* empleada utiliza cinco llamadores que aumentan la especificidad y la sensibilidad significativamente, y genera por variante, unos parámetros consenso de cobertura y calidad, a los cuales es posible acceder de forma individual.

08.1 | Envío de los ficheros de secuenciación

01 Previo al acceso a **Client Site** de Health in Code, S.L., se utilizará un servidor SFTP para subir ficheros a la plataforma. Por razones de seguridad, enviaremos los datos de conexión al responsable de la subida de datos.

- ➔ Host name: xx.xx.xx.xx
- ➔ Port number: xxxx
- ➔ Username: YYYYYYYYYYYY
- ➔ password: XXXXXXXXXXXX

02 Para poder conectarse al servidor, los usuarios deben utilizar un software semejante a WinSCP (<https://winscp.net/eng/download.php>) o Filezilla, ambos gratuitos. En la siguiente figura podemos observar el acceso mediante WinSCP.

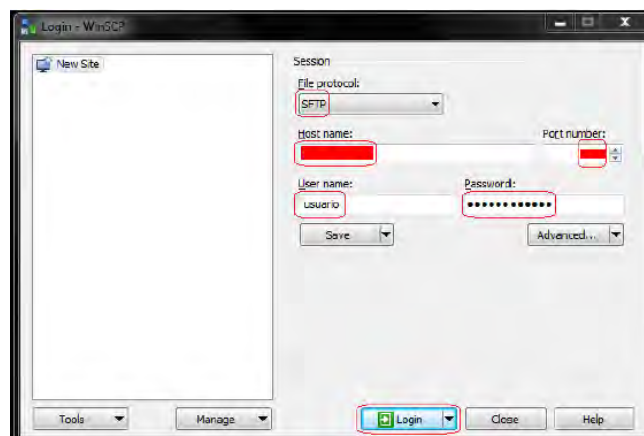


Figura 25. Ejemplo de acceso a SPTF con WinSCP

03 Una vez en el servidor, los datos deben subirse en la carpeta *"incoming"*. Los ficheros que deben subirse son:

- + Los *FASTQ*
- + La *SampleSheet* del ensayo

+ Una plantilla que contenga los datos de la muestra y la asociación del *FASTQ* con (en negrita los campos obligatorios):

- ◇ Centro/Hospital
- ◇ Solicitante
- ◇ Fenotipo o Fenotipo sospechoso (MCD, HCM, ARVD, etc.)
- ◇ Iniciales paciente
- ◇ ID familia
- ◇ ID paciente
- ◇ DOB
- ◇ Sexo (Hombre/Mujer)
- ◇ Nombre archivo FASTQ



NOTA: Al inicio del proyecto facilitaremos al usuario las plantillas y la configuración necesarias

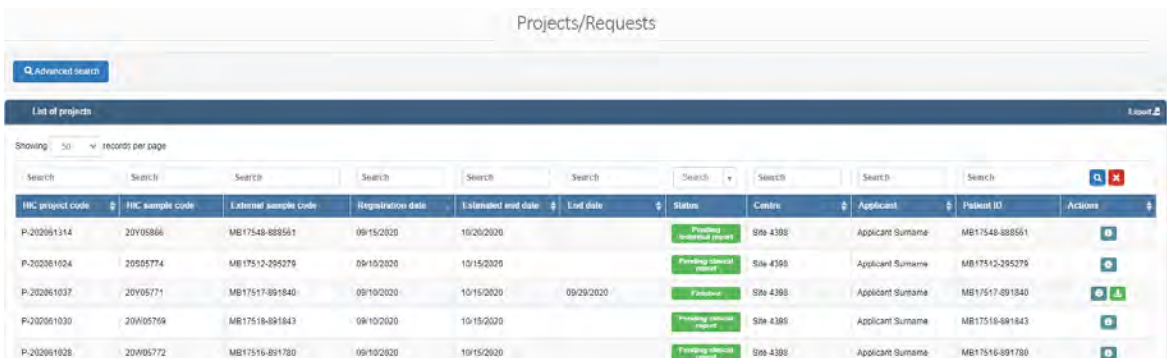
08.2 | Acceso a la plataforma y gestión de solicitudes

Para acceder a **Client Site** es necesario un usuario y una contraseña que será facilitada por e-mail por nuestro equipo IT de Health in Code, S.L. Si es la primera vez que accede, por motivos de seguridad, se le pedirá una contraseña nueva.

Una vez dentro de la plataforma, en la pantalla de inicio se muestran gráficas y estadísticas sobre todos los estudios solicitados.

En el menú de "Proyectos/Solicitudes" se muestra un listado detallado de los proyectos (Figura 26). La tabla contiene los códigos de identificación de los proyectos/solicitudes y su muestra asociad, cliente/centro, fecha de registro, fecha estimada de finalización, fecha de finalización (proyectos terminados), ID del paciente y estado actual.

A través del botón  se accede a los detalles del proyecto. El usuario puede buscar información más concreta utilizando los filtros que se encuentran en el encabezado de la tabla o realizar una búsqueda más detallada con el botón "Advanced search". Los datos mostrados pueden exportarse en formato XML o Excel clicando en el botón  que se encuentra en el margen superior derecho de la pantalla.



The screenshot shows a web interface titled "Projects/Requests". At the top, there is a search bar with "Advanced search" and a "List of projects" header. Below the header, there is a table with columns for project details. The table includes a search bar and a "Showing 50 records per page" indicator. The table data is as follows:

HIC project code	HIC sample code	External sample code	Registration date	Estimated end date	End date	Status	Centre	Applicant	Patient ID	Actions
P-202061314	20Y05866	MB17548-888561	09/15/2020	10/20/2020		Finished (successful project)	Site 4388	Applicant Sumana	MB17548-888561	
P-202061024	20Y05774	MB17512-295276	09/10/2020	10/15/2020		Pending clinical review	Site 4388	Applicant Sumana	MB17512-295276	
P-202061037	20Y05771	MB17517-891840	09/10/2020	10/15/2020	09/29/2020	Failed	Site 4388	Applicant Sumana	MB17517-891840	
P-202061030	20Y05769	MB17518-891843	09/10/2020	10/15/2020		Pending clinical review	Site 4388	Applicant Sumana	MB17518-891843	
P-202061028	20Y05772	MB17516-891780	09/10/2020	10/15/2020		Pending clinical review	Site 4388	Applicant Sumana	MB17516-891780	

Figura 26. Listado de proyectos

En la pantalla "Detalles de proyecto" se podrá encontrar información sobre la fecha de registro, la muestra asociada, el cliente/hospital, etc. En las pestañas "Estudios", "Documentos", "Estado", "Informes" y "Acceso" se mostrará más información del proyecto.

En el menú “Estudios”, situado dentro de “Proyectos/Solicitudes”, aparece un listado detallado de los estudios accesibles (Figura 27). La tabla contiene información sobre los servicios y paneles solicitados para las muestras, el cliente, la fecha de registro, el estado actual de la muestra y los datos relacionados con la identificación del paciente y la muestra.

Study code	Registration date	Project code	Project state	Center	Applicant	Patient ID	HIC sample code	External sample code	Service type	Service	Panel	Actions
E-202071740	09/15/2020	P-202061314	Completed (technical report)	Site 4390	Applicant Surname	MB17548-88551	20V05866	MB17548-88551	NGS-Full	DILATED CARDIOMYOPATHY PANEL	Dilated Cardiomyopathy (121 genes)	[Info] [Export]
E-202071434	09/10/2020	P-202061037	Failed	Site 4366	Applicant Surname	MB17517-891840	20V05771	MB17517-891840	NGS-Full	ARRHYTHMOGENIC CARDIOMYOPATHY PANEL	Arrhythmogenic Cardiomyopathy (26 genes)	[Info] [Export]
E-202071427	09/10/2020	P-202061030	Pending clinical report	Site 4366	Applicant Surname	MB17518-891843	20V05769	MB17518-891843	NGS-Full	ARRHYTHMOGENIC CARDIOMYOPATHY PANEL	Arrhythmogenic Cardiomyopathy (26 genes)	[Info] [Export]
E-202071425	09/10/2020	P-202061028	Pending clinical report	Site 4366	Applicant Surname	MB17516-891780	20V05772	MB17516-891780	NGS-Full	ARRHYTHMOGENIC CARDIOMYOPATHY PANEL	Arrhythmogenic Cardiomyopathy (26 genes)	[Info] [Export]

Figura 27. Listado de estudios

Al igual que en el panel “Proyectos/Solicitudes”, se podrá buscar información más concreta utilizando los filtros o el botón “Advanced search”. Los datos mostrados podrán ser exportados en formato XML o Excel.

A través del botón se podrá acceder a los detalles del estudio. En esta página se encuentra la información sobre el servicio de solicitudes, el panel, la librería seleccionada, variantes genéticas detectadas, estadísticos de cobertura, CNVs, visor IGV para revisar el alineamiento, archivos descargables (entre los que se encuentran los ficheros *fastq* y los ficheros de alineamiento), parámetros de calidad (entre los que se encuentra el STID), etc.

08.3 | Estadísticos de cobertura

A través de la pestaña del mismo nombre, se accede a los estadísticos de cobertura. En primer lugar, aparece una tabla resumen con datos de cobertura de las librerías, seguida de varios gráficos interactivos representativos de la cobertura obtenida.

Por último, se incluye un listado de cobertura por región (Figura 28), que incluye un filtro de búsqueda avanzada, mediante el cual se pueden variar los datos mostrados en la tabla, la cual puede ser exportada en Excel.

Gene	Coding region	Cod. Reg. Category	Chromosome	Initial position	Final position	Size (pb)	No. pb cov. > 50%	No. pb cov. > 10%	No. pb cov. > 10%	Average coverage	No. pb uncovered	No. pb cov. [1-5]	No. pb cov. [6-10]	No. pb cov. [10-20]	No. pb cov. > 30%
DES (***)	4588	exon-cdna	2	220283165	220283782	578	578	0	100%	225.61	0	0	0	0	578
DES (***)	4589	intron-spl	2	220283763	220283772	10	10	0	100%	42.80	0	0	0	0	10
DES (***)	4592	intron-spl	2	220284907	220284816	10	10	0	100%	328.80	0	0	0	0	10
DES (***)	4593	exon-cdna	2	220284817	220284877	61	61	0	100%	376.61	0	0	0	0	61
DES (***)	4594	intron-spl	2	220284878	220284907	10	10	0	100%	394.60	0	0	0	0	10
DES (***)	4596	intron-spl	2	220284962	220284972	10	10	0	100%	350.80	0	0	0	0	10
DES (***)	4597	exon-cdna	2	220284973	220285068	96	96	0	100%	299.89	0	0	0	0	96
DES (***)	4598	intron-spl	2	220285069	220285076	10	10	0	100%	250.40	0	0	0	0	10
DES (***)	4600	intron-spl	2	220285207	220285216	10	10	0	100%	241.10	0	0	0	0	10

Figura 28. Estadísticos de cobertura por región

08.4 | Filtrado de variantes

A través de la pestaña "Variantes" se accede al filtrado de variantes pre-fijado, diseñado para mostrar únicamente las variantes más relevantes, con un valor de calidad mayor a 100 (la máxima calidad es 250).


El filtro puede ser variado o eliminado clicando en el botón "Búsqueda avanzada", donde se puede filtrar por gen, prioridad (prioritarios, secundarios o candidatos), cromosoma, tipo de variante, etc. Para eliminar un filtro será necesario clicar en "Limpiar filtro" y posteriormente en "Buscar", si lo deseado es variar el filtro, una vez cambiados los parámetros, clicar "Buscar".

Los tres tipos de prioridades de los genes disponibles son:

- **Genes prioritarios:** Aquellos genes para los que existe la suficiente evidencia clínica y funcional como para considerarlos asociados a la enfermedad. Dichos genes se encuentran incluidos en las guías clínicas.
- **Genes secundarios:** Aquellos genes relacionados con la enfermedad, pero con un nivel de evidencia menor.
- **Genes candidatos:** Aquellos genes potencialmente asociados a la enfermedad, pero con una evidencia en humanos insuficiente, como para situarlos en las categorías anteriores.

El listado de variantes muestra información relevante para cada variante identificada en el estudio:

- ↘ Nombre de variantes en niveles: cromosómico, genómico y cDNA.
- ↘ El contaje (detecciones/número de veces que se ha estudiado el gen) de la variante en la base de datos global de HIC, así como la cuenta únicamente en pacientes relacionados con la cuenta del solicitante.
- ↘ La frecuencia de la variante en la base de datos gnomAD.
- ↘ La patogenicidad de la variante incluida en la base de datos de Health in Code, S.L., así como la patogenicidad establecida manualmente por el usuario.
- ↘ Valores diferentes de calidad.
- ↘ Resumen de las poblaciones asociadas con la variante.
- ↘ Indicadores de patogenicidad reportados por la base de datos ClinVar, así como la preselección de la variante como relevante por el equipo clínico de HIC o por el usuario.

Para cada variante detectada existe una página que detalla información a nivel de proteína, cDNA y ADN, así como información sobre el gen asociado, estadísticas de población, predictores y artículos relacionados con la variante y su enlace a PubMed. Se puede acceder a esta información a través del botón  de cada variante.

A través de "Poblaciones y predictores", además de acceder a distintos estadísticos de la variante en la población, incluido uno propio de HIC, se muestran diferentes enlaces a bases de datos externas como OMIM, NCBI, HGNC, HPO, etc.

08.5 | Categorización de las variantes

Los usuarios pueden establecer el valor de patogenicidad de las variantes en sus estudios. Este valor puede ser modificado desde el apartado de detalles de cada variante en el campo de "Patogenicidad" (Figura 29), donde aparecerá un desplegable con las diferentes opciones. Además, es posible revisar el historial de los valores que se han puesto a lo largo del tiempo. Este valor aparecerá en la tabla de resultados con el acrónimo de "Pat". Los usuarios podrán filtrar estos valores usando la búsqueda avanzada.

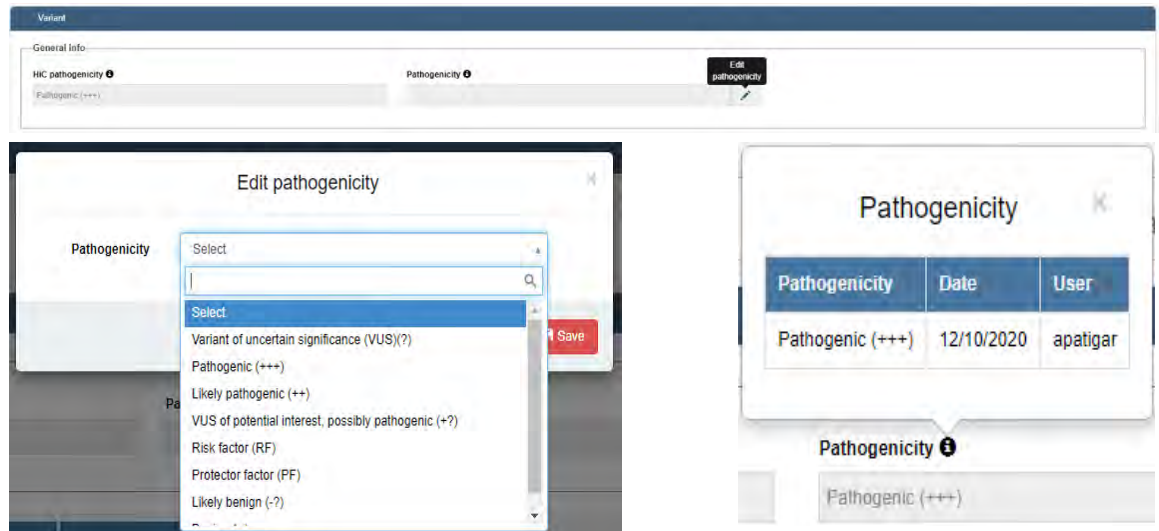




Figura 29. Establecer patogenicidad.

Se podrá marcar y desmarcar como variante pre-seleccionada todas aquellas variantes de interés, clicando el botón , localizado en la lista de resultados. Estas variantes se indicarán en la columna "info" con un símbolo de estrella azul, mientras que las variantes pre-seleccionadas por el equipo clínico de HIC aparecerán con una estrella roja. Las variantes pre-seleccionadas podrán filtrarse usando la búsqueda avanzada.

En la búsqueda avanzada de variantes es posible filtrar por aquellos fenotipos que se incluyen en la base de datos HPO y que están asociados a cada una de las variantes. El botón de info muestra los genes asociados con el fenotipo incluido en el filtro. Además, la página que detalla cada variante contiene una tabla con los fenotipos HPO asociados con dicha variante, junto con un enlace directo a la base de datos HPO. La búsqueda avanzada podrá utilizar estos términos para filtrar las variantes relacionadas.

Los datos mostrados en la tabla de variantes se podrán exportar en formato Excel clicando el botón  en la parte superior derecha de la tabla. Los datos exportados contienen los detalles de cada variante incluida en la tabla inicial e información relevante poblacional, predictores, así como los valores establecidos por el usuario sobre patogenicidad y variantes pre-seleccionadas.

Seleccionando el botón "Generar informe", situado sobre la tabla de variantes, se generará un informe en formato .docx, disponible en inglés y castellano. Dicho informe incluirá todas las variantes pre-seleccionadas por el usuario, así como los comentarios asociados a cada variante, y un espacio para que el usuario genere los comentarios sobre el estudio, que se puede rellenar en el panel de detalles del estudio, seleccionando el botón "Añadir resultado". Además de los datos de la variante, el informe incluirá información de bases de datos como gnomAD y EVS.

08.6 | Análisis de grandes reordenamientos (CNVs)

El análisis de grandes reordenamientos o CNVs (variación en el número de copias) a partir de datos de secuenciación NGS, consiste en una correlación entre el número de lecturas normalizadas de una región con respecto al número de copias de ADN para dicha región.

Dado que el número de lecturas debe ser normalizado entre diferentes muestras, la variabilidad entre muestras empeorará la identificación de las CNVs y, por tanto, es muy importante homogenizar en la medida de lo posible las condiciones experimentales entre diferentes muestras y entre diferentes regiones genómicas de una misma muestra. Para reducir la variabilidad y asegurar un correcto análisis de las CNVs se aconseja seguir las siguientes recomendaciones:

- 01** Es necesario que las condiciones de preparación de librerías y del proceso de captura sean homogéneas y para ello los diferentes pasos se deben llevar a cabo de manera simultánea con las muestras del mismo ensayo de secuenciación, utilizando de forma simultánea los mismos equipos y siguiendo las indicaciones especificadas en el apartado 7 de este documento.
- 02** El ADN de partida es otra fuente de variabilidad. Por tanto, se aconseja que todos los ADNs analizados hayan sido extraídos siguiendo los mismos protocolos de extracción.

Cuando las muestras pertenecientes al mismo ensayo se procesan bioinformáticamente con la *pipeline*, se inicia el análisis de CNVs. Seleccionando la pestaña "CNVs" dentro de un estudio aparecerá el enlace a través del cual se accede al análisis.

El análisis se basa en la comparación de los patrones de cobertura a lo largo de todas las muestras. En primer lugar, se genera un modelo de cobertura para cada run utilizando todas las muestras que contiene. Para construir un buen modelo de cobertura, el *software* necesita un mínimo de ocho muestras procesadas con el mismo protocolo y secuenciadas juntas, ya que las muestras de un run serán agrupadas por similitud, por lo que no todas serán empleadas para hacer la referencia de todas las librerías del run.

El proceso de análisis reportará todas las regiones candidatas en las que se ha detectado una potencial CNVs y les asignará una puntuación y unas mediciones, que permiten evaluar la confianza de cada CNV candidata. En la Figura 30 encontramos un ejemplo de detección de CNVs.

En la tabla de CNVs candidatas (Figura 30, A) se mostrará cada CNV con una serie de información asociada, posicionando el ratón sobre la cabecera se mostrará una breve explicación de la función de cada columna. Algunos de ellos son:

- +** **Score de calidad:** Con un rango de 0 a 10, valora de manera creciente la confianza en que la alteración detectada sea provocada por una CNV real. En esta puntuación de calidad influyen el tamaño del evento, los *breakpoints* detectados, el ratio, la variación del ratio a lo largo de la región afectada, desviación respecto al modelo y la cobertura.
- +** **Dev (desviación):** Representa la desviación de la señal de la muestra estudiada con respecto a la señal de referencia. El segundo valor (marcado en gris) representa la variación asociada a dicha medida.
- +** **Ratio:** Representa el ratio entre la señal problema y la de referencia. El segundo valor (marcado en gris) se refiere a la variación asociada a dicha medida.




Figura 30. Plot de CNVs.

A. Listado de locus candidatos a estar afectados por una CNV listados de mayor a menor Score de calidad.

B. Para la CNV seleccionada, las coberturas normalizadas para todas las muestras incluidas en el análisis (en negro), para la muestra seleccionada (en rojo), y para un modelo de referencia generado durante la validación (en verde).

C. Para la CNV seleccionada ratios de cigosidad de la muestra seleccionada (en rojo) y el resto de muestras incluidas en el análisis (en negro).

Las CNVs mostradas pueden ser filtradas, haciendo *click* en el botón del filtro , situado en la tabla de genes candidatos, en la parte superior izquierda. Aparecerán cinco filtros recomendables. Son los siguientes:

- ⌵ **Filter candidates with not compatible split reads information:** Filtrará todas las CNVs parciales en las que no se encuentren lecturas que cubran tanto la zona con CNV como la adyacente, conocidas como *split reads*, y por tanto son susceptibles de ser un FP.
- ⌵ **Filter not germinal characteristics ratios:** Filtrará todas las CNVs con ratios fuera del rango establecido por el filtro.
- ⌵ **Filter not stable ratios:** Filtrará todas las CNVs con ratios no estables según los valores establecidos.
- ⌵ **Filter not clear deviation:** Filtrará todas las CNVs con una baja desviación de la cobertura respecto a la referencia.
- ⌵ **Filter low scored candidates:** Filtrará todas las CNVs con una puntuación de calidad inferior a 7, por su alta probabilidad de ser un FP.

Además, en la pantalla de filtrado se pueden eliminar o añadir genes dentro de los grupos prioritarios, secundarios y candidatos.

Por su alto valor predictivo se recomienda el uso de los filtros de eventos sin *Split reads*, de *low scored*, y el de baja desviación de la cobertura.

IMPORTANTE: Revisar el sexo asignado de la muestra. Si el sexo asignado no es el esperado podría dar lugar a FP en los cromosomas sexuales. El sexo aparece en la parte superior de la pantalla, centrado junto al código HIC de la muestra.

Por último, se realiza un control de calidad para cada ejecución, que otorga unos valores de calidad generales para cada análisis de CNVs. Se puede acceder a él a través del icono 🛠️, situado en la parte superior de la pantalla de análisis de CNVs.

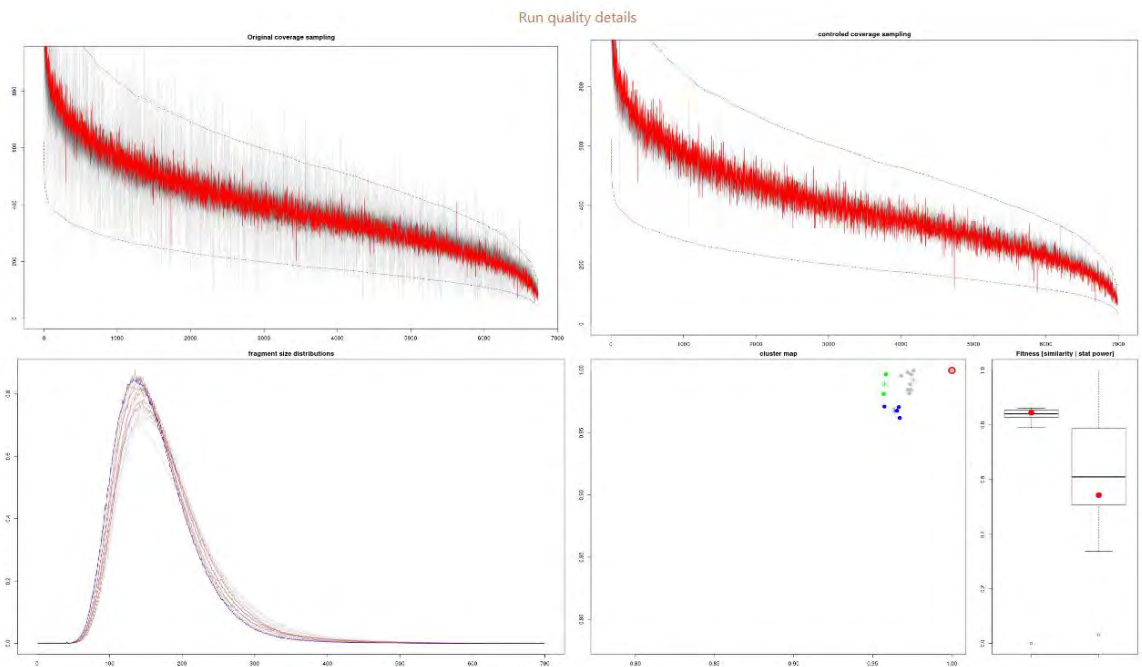


Figura 31. Gráficas de calidad del análisis de CNVs

En la Figura 31 se observa un ejemplo de este análisis. Los gráficos superiores muestran la distribución de coberturas de la muestra con respecto al resto de muestras del análisis, a la izquierda se muestra marcando en gris las muestras que no se han usado el análisis de CNVs de esta muestra, y a la derecha se observa el mismo gráfico sin dichas muestras. Los gráficos inferiores muestran de izquierda a derecha: distribución de tamaños del fragmento, marcando en azul la muestra en cuestión, y al resto en distintos colores en función de las poblaciones de tamaños; mapa de grupos, en el que se puede ver cada grupo de un color, y comparar las diferencias entre librería analizada (rodeada en rojo) con el resto de librerías de su mismo grupo (marcadas del mismo color), y con librerías de otros grupos (marcadas en otros colores); diagrama de cajas de la similitud de las librerías y el valor predictivo del análisis

09 Troubleshooting

A continuación, se enumeran los posibles resultados no esperados y las directrices para su solución para el protocolo de preparación de librerías y secuenciación utilizando **Inherited CardioKitDx**. Para la solución de otros problemas generales del equipo Magnis que no aparezcan en este apartado, consulte la guía del usuario del instrumento

+ El uso de la pantalla táctil para la configuración del ensayo presenta problemas de funcionalidad:

Como alternativa a los controles de la pantalla táctil, es posible el uso de un ratón conectado por USB a cualquiera de los dos puertos situados en la parte frontal del instrumento. Una vez conectado, se podrán realizar selecciones en la interfaz que se muestra en la pantalla táctil.

Para restablecer la funcionalidad de la pantalla táctil será necesario reiniciar el sistema.

+ Las luces del indicador LED del instrumento se iluminan en rojo y la pantalla táctil muestra el mensaje de error *"Teach points are shifted. Please perform auto teaching from the Settings screen"*:

Este mensaje de error aparece cuando el *Instrument Health Check (IHC)* no ha superado alguno de sus puntos de control, lo que indica que dicho punto puede estar oculto, o que el instrumento necesita realizar una rutina de programación *Auto Teaching* antes de configurar un ensayo. Para preparar el equipo para el ensayo, realizar los siguientes pasos:

- 01 Verificar que todas las posiciones del equipo estén libres de material fungible del kit y otros residuos. La presencia de cualquier material en el equipo puede impedir la detección exitosa de todos los puntos de control verificados.
- 02 Limpiar la ventana del escáner de *barcode* según las instrucciones de limpieza de la Guía del usuario del equipo Magnis. Los residuos o huellas dactilares en el escáner pueden oscurecer los puntos de control verificados y, en consecuencia, provocar un fallo en la verificación.
- 03 Reiniciar el sistema. Después de iniciar sesión, el instrumento realizará otro IHC. Si esta comprobación de estado se completa satisfactoriamente, puede reanudar el proceso de configuración sin realizar la rutina *Auto Teaching*.

Si el IHC no se completa satisfactoriamente, se deberá llevar a cabo la rutina de *Auto Teaching* siguiendo los siguientes pasos:

- 01 En la pantalla *Home*, abrir la pantalla *Settings* y presionar *Auto Teaching*. Seguir las instrucciones que aparecen en la pantalla táctil. El proceso de *Auto Teaching* tarda aproximadamente 30 minutos y requerirá la presencia del usuario para la colocación del material de laboratorio en el instrumento.
- 02 Una vez finalizado el proceso de *Auto Teaching*, comenzar con la configuración del ensayo presionando *"Run Protocol"*, en la pantalla *"Home"*.

- + Las luces del indicador LED del instrumento se iluminan en rojo y la pantalla táctil muestra un mensaje de error de *Instrument Health Check (IHC)*:

Se recomienda reiniciar el instrumento después de un fallo del IHC, siguiendo los pasos que se indican a continuación:

- 01 En el cuadro de diálogo del error, presionar “*Cancel*” para rechazar el inicio de la prueba de diagnóstico.
- 02 Presionar el icono de error en la parte inferior de la pantalla y registrar el código de error para su posible uso en la solución de problemas con el soporte técnico de Agilent.
- 03 Apagar el instrumento presionando el botón de encendido en la parte frontal del instrumento.
- 04 Verificar que todas las posiciones del equipo estén libres de material fungible del kit y otros residuos. La presencia de cualquier material en la unidad del instrumento puede interferir con el IHC tras el reinicio.
- 05 Encender el instrumento presionando el botón de encendido.
- 06 Después de iniciar sesión, el equipo realizará otro IHC. Si esta comprobación de estado se completa satisfactoriamente, comenzar la configuración del ensayo. Si el IHC vuelve a fallar, póngase en contacto con el servicio de soporte técnico de Agilent para solicitar asistencia.

- + La pantalla *Verify Labware* informa de un problema con uno o más componentes del material de laboratorio después de hacer la verificación automatizada del material:

Si todos o la mayoría de los materiales de laboratorio no superan la verificación, es posible que sea necesario limpiar la ventana del escáner. Consultar la Guía del usuario del instrumento para seguir las instrucciones de limpieza. Una vez finalizada la limpieza, repetir el paso *Verify Labware*.

Si sólo uno o unos pocos componentes del material de laboratorio no superan la verificación, presionar el icono de error en la parte inferior de la pantalla para expandir la información de la posición con error, y de esta forma consultar el motivo del fallo.

- ◇ *Si el escáner de códigos de barras no puede escanear un componente concreto del material de laboratorio:*

Comprobar que el material de laboratorio está presente en la posición requerida y orientado correctamente (revisar el apartado 7 de este documento para ver los pasos completos de carga del equipo). En caso de haberlos, corregir los errores y repetir el paso *Verify Labware*. Si todos los componentes están presentes y orientados correctamente, inspeccionar visualmente el código de barras para verificar su integridad. Para un escaneo exitoso, los *barcodes* no deben presentar arañazos, manchas, condensación, obstrucción por sellos de aluminio ni marcas de escritura o de otro tipo en el material plástico. En caso de que haya algún *barcode* dañado, será necesario sustituir el componente y repetir el paso *Verify Labware*.

- ◇ *Si el material de laboratorio escaneado ha caducado:*

Sustituir cualquier componente caducado con componentes no caducados y, a continuación, repetir el paso *Verify Labware*.

◇ *Si el material de laboratorio escaneado está en una posición incorrecta:*

Sustituir el material de laboratorio inadecuado por el componente correcto y repetir el paso *Verify Labware*.

+ **Tamaños superiores a los esperados tras la fragmentación mecánica del ADN:**

Cualquier burbuja presente en el filamento de los *microTUBEs* del sonicador, pueden interferir con la fragmentación. Asegúrese de la ausencia de burbujas antes de proceder con la fragmentación, centrifugando los *microTUBEs* brevemente si fuera necesario.

+ **Tamaños superiores a los esperados tras la fragmentación enzimática del ADN:**

- ◇ El protocolo de fragmentación incluye pasos de descongelación, control de temperatura, pipeteo y mezcla, requeridos para un rendimiento óptimo del proceso.
- ◇ El uso de otros termocicladores diferentes al indicado puede requerir un ajuste de los tiempos de incubación.
- ◇ Asegúrese de cumplir con todas las instrucciones antes de comenzar el protocolo.
- ◇ Verifique la ausencia de burbujas antes de colocar las reacciones de fragmentación en el termociclador. La presencia de burbujas puede reducir la eficiencia del proceso.
- ◇ Asegúrese de estar empleando un material fungible compatible con el termociclador empleado, de no hacerlo no se estará obteniendo un rendimiento óptimo del proceso.

+ **La pantalla táctil muestra un valor de Time Remaining de 0:00 al final del ensayo durante cierto tiempo sin pasar a las pantallas de ensayo/recolección de muestras:**

El valor *Time Remaining* mostrado en la pantalla táctil es sólo una estimación del tiempo restante del ensayo, y puede permanecer en 0:00 durante varios minutos antes de que el sistema esté listo para comenzar la recolección de muestras. Esto no indica que haya problemas ni en el ensayo ni en el instrumento.

+ **Bajo rendimiento de las librerías de post-captura:**

Comprobar que la muestra de ADN de entrada cumple con las directrices de calidad y concentración especificadas.

Comprobar que el ensayo se haya configurado para la concentración y calidad de ADN adecuadas. En la pestaña *Run Setup* de la pantalla *Post Run Data* se puede revisar la configuración de los ensayos llevados a cabo.

Comprobar que los ensayos se realicen en condiciones de humedad del 30% al 70% (sin condensación). Fuera de este rango de humedad el rendimiento puede verse afectado.

Un rendimiento muy bajo o nulo en una o más muestras del ensayo puede ser indicativo de un problema con las puntas empleadas en el ensayo. Para llevar a cabo el protocolo correctamente, las cajas de puntas deben estar completamente llenas, bien fijadas y dentro de los marcos de sus plataformas.

+ Densidad del *cluster* diferente de lo esperado:

En este caso es recomendable revisar la cuantificación de librerías y el protocolo de generación del pool de librerías antes de secuenciar.

+ Errores en el STID:

En caso de utilizar los reactivos de trazabilidad de muestras proporcionados por Health in Code, S.L., es posible que ocurra que el STID no coincida con el esperado. En este caso, se recomienda comprobar los STID especificados en la Hoja de muestras.

+ Problemas de cobertura:

Los problemas de cobertura que afectan a otras regiones además de las incluidas en la sección de limitaciones del kit, pueden deberse a una mala calidad del ADN o problemas en el protocolo de preparación y / o captura de las librerías. Se recomienda verificar la calidad del ADN inicial y si el problema de calidad afecta a todas las muestras, se recomienda revisar todos los pasos del protocolo.

10 Limitaciones

10.1 | Analíticas

- ◇ **Inherited CardioKitDx** está diseñado para identificar variantes del tipo SNV e INDEL en las regiones codificantes de los genes especificados en el apartado 2 de este documento. Health in Code, S.L. únicamente asegura la correcta identificación de este tipo de variantes en regiones no-codificantes que pertenezcan a alguna de las siguientes categorías:
 - ↳ Distancia al exón codificante inferior a 10 pb.
 - ↳ Cumplan los criterios de calidad establecidos.
 - ↳ Variantes intrónicas de interés clínico, catalogadas como *hotspot* y especificadas en el apartado 2 de este documento.
 - ↳ Variantes en regiones no traducidas (UTR, del inglés *untranslated region*) y en los promotores que hayan sido explícitamente detalladas en la sección 2 como regiones diana.

- ◇ La tecnología empleada no otorga una buena secuenciación en regiones ricas en CG, que presenten una alta homología en su secuencia, como pueden ser genes homólogos, pseudogenes, etc., pudiendo dar lugar a falsos positivos o negativos. Las regiones de **Inherited CardioKitDx** con una homología del 100% con regiones pseudogénicas aparecen listadas a continuación.

Gen	Cromosoma	Posición de inicio	Posición de fin	Tamaño (pb)	Categoría
CASZ1	chr1	10698999	10700116	1118	exon-cDNA
OBSCN	chr1	228522781	228522999	219	exon-cDNA
OBSCN	chr1	228523000	228523009	10	intron-spl
OBSCN	chr1	228566122	228566131	10	intron-spl
SPEG	chr2	220299700	220300087	388	exon-cDNA
SPEG	chr2	220312696	220313993	1298	exon-cDNA
SPEG	chr2	220347820	220349794	1975	exon-cDNA
OBSL1	chr2	220422341	220422350	10	intron-spl
PKD2	chr4	88928886	88929480	595	exon-cDNA
PKD2	chr4	88929481	88929490	10	intron-spl
SYNGAPI	chr6	33388042	33388108	67	exon-cDNA
SYNGAPI	chr6	33388109	33388118	10	intron-spl
KCNK17	chr6	39278659	39278668	10	intron-spl
GATAD1	chr7	92077293	92077302	10	intron-spl
GATA4	chr8	11565822	11566437	616	exon-cDNA
SURF1	chr9	136223176	136223185	10	intron-spl

SURF1	chr9	136223266	136223275	10	intron-spl
SURF1	chr9	136223276	136223329	54	exon-cDNA
NOTCH1	chr9	139440178	139440238	61	exon-cDNA
MYH6	chr14	23852530	23852539	10	intron-spl
SCN1B	chr19	35521725	35521764	40	exon-cDNA
SCN1B	chr19	35521765	35521774	10	intron-spl
RRAS	chr19	50139110	50139119	10	intron-spl
SNTA1	chr20	32031117	32031426	310	exon-cDNA
TXNRD2	chr22	19929214	19929223	10	intron-spl
TXNRD2	chr22	19929224	19929326	103	exon-cDNA

Tabla 10. Listado de regiones pseudogénicas.

- ◇ Por debajo de los parámetros de calidad establecidos no podemos dar garantías de los resultados obtenidos.
- ◇ La tecnología NGS todavía no se considera la técnica *Gold Standard* para algunos tipos de mutación, por lo que se recomienda, siempre que sea posible, confirmar los resultados positivos mediante una tecnología complementaria y estandarizada.
- ◇ Todos los datos e información obtenida deben ser evaluados e interpretados por el clínico, de manera integrada, junto con el resto de información clínica del paciente.
- ◇ Todos los datos e información obtenida deben ser evaluados e interpretados clínicamente por el clínico, de manera integrada, junto con el resto de información clínica del paciente y otros resultados de pruebas analíticas o de imagen complementarias.

10.2 | Equipos

Inherited CardioKitDx ha sido validado usando el siguiente termociclador para la fragmentación del ADN.

- + **GeneAmp PCR System 9700** (Applied Biosystems) para la fragmentación enzimática.
- + **ME220 Focused-ultrasonicator** (Covaris) para la fragmentación mecánica.

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

Inherited CardioKitDx ha sido validado usando el siguiente equipo automatizado de preparación de librerías:

- + **Magnis NGS Prep System**, de Agilent Technologies (cat. no. G9710AA)

Inherited CardioKitDx ha sido validado usando la siguiente plataforma de secuenciación masiva:

- + **NextSeq 500/550 System** (Illumina)

Este kit únicamente es compatible con plataformas de secuenciación masiva de Illumina. En caso de utilizar otros equipos de secuenciación masiva distintos al *NextSeq 500/550 System*, la concentración final de las librerías tendrá que ajustarse a las especificaciones de los protocolos específicos de dichas plataformas.

10.3 | Reactivos

Inherited CardioKitDx se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y los recomendados en el apartado 6 de este manual (Equipos y materiales necesarios que no se suministran).

Para la secuenciación por NGS se recomienda emplear los reactivos recomendados por el proveedor del secuenciador: **Illumina**.

En caso de duda, por favor contacte con el soporte técnico de Health in Code, S.L.

10.4 | Plataforma de análisis bioinformático

Inherited CardioKitDx ha sido validado empleando **Client Site**, plataforma de análisis bioinformático para diagnóstico *in vitro*. Dicha plataforma incluye una *pipeline* de análisis diseñada especialmente para **Inherited CardioKitDx**, la cual permite la detección de todas las dianas especificadas en el apartado 2 de este documento.

En caso de usar otra plataforma de análisis, Health in Code, S.L. no se hace responsable de los resultados obtenidos.

10.5 | Estabilidad del producto

El funcionamiento óptimo de este producto está confirmado siempre que se apliquen las condiciones recomendadas de almacenamiento especificadas dentro de la fecha óptima del producto asociada a cada lote de producción.

Contacte con el Departamento Técnico de Health in Code, S.L. para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos:

✉ tech.support@healthincode.com

☎ +34 963 212 340

healthincode



Conoce todos nuestros
kits de diagnóstico

