



# Instrucciones de uso

## Inherited NephroKitDx

Ref. IMG-370

CE IVD

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 NephroKitDx** 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 nuestro Departamento Técnico:

 +34 963 212 340

 [tech.support@healthincode.com](mailto:tech.support@healthincode.com)

Modificaciones de las Instrucciones de Uso (IFU)		
Versión 09	DIC 2023	Revisión y actualización del apartado "3. Características técnicas".
Versión 08	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). Actualización del apartado 8.2 y 8.4 para aclarar el funcionamiento de los filtrados.
Versión 07	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 06	OCT 2022	Cambio de la identificación del fabricante: de Imegen a HEALTH IN CODE, S.L y actualización del filtrado de variantes (apartado 8.2)
Versión 05	JUL 2022	Actualización del filtrado de variantes (apartado 8.3)
Versión 04	JUL 2022	Actualización de los apartados 5 y 7.2.1
Versión 03	JUN 2022	Modificación programa de fragmentación
Versión 02	MAY 2022	Actualización por marcado CE/IVD del producto

# índice

---

<b>01</b>	<b>Información general</b>	<b>4</b>
<b>02</b>	<b>Uso previsto</b>	<b>5</b>
<b>03</b>	<b>Características técnicas</b>	<b>7</b>
<b>04</b>	<b>Advertencias y precauciones</b>	<b>8</b>
<b>05</b>	<b>Contenido y condiciones de almacenamiento del kit</b>	<b>9</b>
<b>06</b>	<b>Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran</b>	<b>11</b>
<b>07</b>	<b>Protocolo de ensayo</b>	<b>13</b>
07.1	Preparación del instrumento Magnis para ejecutar un protocolo	13
07.2	Preparación y fragmentación del ADN molde	14
07.3	Preparación de los reactivos y fungible empleado en el sistema Magnis	17
07.4	Ejecución del protocolo de preparación de las librerías	19
07.5	Limpieza del equipo después de un ensayo	28
07.6	Validación y cuantificación de las librerías	28
07.7	Desnaturalización de las librerías	30
07.8	Configuración de la plataforma NextSeq	31
<b>08</b>	<b>Análisis de los resultados</b>	<b>32</b>
08.1	Solicitud de análisis	32
08.2	Gestión de solicitudes	33
08.3	Análisis de grandes reordenamientos (CNVs)	34
08.4	Filtrado de variantes	36
<b>09</b>	<b>Troubleshooting</b>	<b>38</b>
<b>10</b>	<b>Limitaciones</b>	<b>41</b>
10.1	Analíticas	41
10.2	Equipos	42
10.3	Reactivos	43
10.4	Plataforma de análisis bioinformático	43
10.5	Estabilidad del producto	43

# 01 Información general

Las enfermedades renales comprenden un amplio espectro de patologías de diverso origen, diagnóstico y pronóstico que afectan a millones de personas en todo el mundo, constituyendo una de las causas de mortalidad que mayor impacto está teniendo en la actualidad. En España se estima que la prevalencia de la enfermedad renal crónica afecta a uno de cada siete individuos por lo que estas enfermedades representan una materia de gran interés en el sistema público de salud de nuestro país. Dentro de las enfermedades renales, las nefropatías hereditarias corresponden a más del 5% de todas las enfermedades genéticas conocidas. Por otra parte, alrededor del 10% de las nefropatías que requieren trasplante en adultos, y prácticamente la totalidad de las que lo hacen en niños, son hereditarias. Su prevalencia es muy variable, pudiendo comprender desde aquellas de alta prevalencia en la población general, como la poliquistosis renal autosómica dominante, hasta síndromes de muy baja incidencia. Debido a la heterogeneidad de estas enfermedades y a la naturaleza de las variantes patogénicas, el diagnóstico genético resulta de gran utilidad clínica, facilita el asesoramiento genético y, en numerosas ocasiones, contribuye al pronóstico de la enfermedad.

Gracias a los últimos avances en el campo de la genética y al uso de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, clásicamente conocidas como técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS), los profesionales clínicos e investigadores del campo de la nefrología tienen a su disposición una prueba, necesaria en algunos contextos, para un diagnóstico preciso de la enfermedad, optimización del manejo del paciente, pronóstico de la evolución de la enfermedad y repercusión a nivel de asesoramiento genético.

## Referencias

- > Eckardt KU, Alper SL, Antignac C, Bleyer AJ, Chauveau D, Dahan K, Deltas C, Hosking A, Kmoch S, Rampoldi L, Wiesener M, Wolf MT, Devuyst O; Kidney Disease: Improving Global Outcomes. Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease: diagnosis, classification, and management--A KDIGO consensus report. *Kidney Int.* 2015 Oct;88(4):676-83. doi: 10.1038/ki.2015.28. Epub 2015 Mar 4. PMID: 25738250.
- > Gimpel C, Bergmann C, Bockenhauer D, Breysen L, Cadnapaphornchai MA, Cetiner M, Dudley J, Emma F, Konrad M, Harris T, Harris PC, König J, Liebau MC, Marlais M, Mekahli D, Metcalfe AM, Oh J, Perrone RD, Sinha MD, Titieni A, Torra R, Weber S, Winyard PJD, Schaefer F. International consensus statement on the diagnosis and management of autosomal dominant polycystic kidney disease in children and young people. *Nat Rev Nephrol.* 2019 Nov;15(11):713-726. doi: 10.1038/s41581-019-0155-2. PMID: 31118499; PMID: PMC7136168.
- > Kashtan CE. Alport Syndrome. 2001 Aug 28 [updated 2019 Feb 21]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mirzaa G, Amemiya A, editors. *GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. PMID: 20301386.*
- > *Eur J Hum Genet.* 2020 Oct; 28(10): 1368-1378. Pub. 2020 May 28. doi: 10.1038/s41431-020-0642-8 PMID: PMC7608398 PMID: 32467597 "Genetic aspects of congenital nephrotic syndrome: a consensus statement from the ERKNet-ESPN inherited glomerulopathy working group".
- > *Medicines (Basel).* 2020 Aug; 7(8): 44. Published online 2020 Jul 29. doi: 10.3390/medicines7080044 PMID: PMC7459851 PMID: 32751108 "Genetic Alterations in Renal Cancers: Identification of The Mechanisms Underlying Cancer Initiation and Progression and of Therapeutic Targets" Ugo Testa,\* Elvira Pelosi, and Germana Castelli

## 02 Uso previsto

**Inherited NephroKitDx** ha sido diseñado para analizar las secuencias de las regiones codificantes de 529 genes que han sido seleccionados para el estudio de la mayor parte de las patologías renales. Las patologías abordadas mediante la secuenciación de este panel serían las siguientes:

- **Enfermedades glomerulares:** Síndrome nefrótico, GFS, Alport, Glomerulonefritis monogénica, Fabry, Amiloidosis.
- **Enfermedades Tubulointersticiales:** Acidosis metabólica, Alcalosis metabólica (Bartter, Liddle, Gitelman), Diabetes nefrogénica, Raquitismo Hipofosfatémico, Hiperoxaluria, Cistinuria, Nefrolitiasis y otras enfermedades metabólicas del riñón.
- **Enfermedades quísticas del riñón:** Poliquistosis, Nefronoptosis, síndromes con desarrollo de quistes renales y/o hepáticos.
- **CAKUT y otros síndromes con malformaciones renales, en su mayoría correspondientes con patologías pediátricas.**
- **Cáncer renal hereditario.**

Este kit constituye una aproximación para ayudar a los profesionales sanitarios en el abordaje de las nefropatías hereditarias, incluyendo genes asociados al desarrollo de enfermedades glomerulares, enfermedades túbulo-intersticiales, enfermedades quísticas y síndromes polimalformativos del riñón, basados en las guías de diagnóstico y manejo de nefropatías hereditarias actuales, recomendaciones de sociedades científicas y literatura científica destacada.

A continuación, se listan los 529 genes seleccionados para el estudio de las patologías renales abordadas mediante secuenciación del presente panel:

*ACE, ACTB, ACTG1, ACTN4, ADAMTS13, ADAMTS9, ADCY10, AGT, AGTR1, AGXT, AH11, ALG1, ALG8, ALG9, ALMS1, ALPL, AMER1, ANKFY1, ANKS6, ANLN, ANOS1, AP2S1, APOA1, APOA4, APOE, APOL1, APRT, AQP2, ARHGAP24, ARHGDI1, ARL13B, ARL3, ARL6, ARMC9, ATN1, ATP6VOA4, ATP6V1B1, ATP6VIC2, AVIL, AVP, AVPR2, B2M, B3GLCT, B9D1, B9D2, BBIP1, BBS1, BBS10, BBS12, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS9, BICC1, BMP2, BMP4, BMPER, BNC2, BSCL2, BSND, CIQA, CIQB, CIQC, C3, C4A, C4B, C8ORF37, CA1, CA2, CASP10, CASR, CC2D2A, CCBE1, CCDC28B, CCL2, CCNQ, CD151, CD2AP, CD46, CD81, CD96, CDC42, CDC5L, CDC73, CDK10, CDK20, CDKN1C, CENPF, CEP104, CEP120, CEP164, CEP290, CEP41, CEP55, CEP83, CFB, CFH, CFHR1, CFHR2, CFHR3, CFHR4, CFHR5, CFI, CFP, CHD1L, CHD7, CHRM3, CISD2, CIT, CLCN5, CLCN7, CLCNKA, CLCNKB, CLDN10, CLDN16, CLDN19, CNNM2, COL4A1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6, COPA, COQ2, COQ4, COQ6, COQ7, COQ8A, COQ8B, COQ9, CPLANE1, CPT1A, CRB2, CRKL, CSPP1, CTH, CTLA4, CTNS, CTU2, CUBN, CUL3, CYP24A1, DACH1, DACT1, DCDC2, DCHS1, DDX59, DGKE, DHCR7, DLC1, DMP1, DNAJB11, DNASE1, DSTYK, DVL1, DVL3, DYNC2H1, DYNC2LI1, DZIP1L, EGF, EHHADH, EMP2, ENPP1, EP300, ESCO2, ETFA, ETFB, ETFDH, ETV4, EXOC8, EYA1, FAH, FAM20A, FAN1, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCL, FAS, FASLG, FAT1, FAT4, FCGR2A, FCGR3A, FGA, FGF10, FGF20, FGF23, FGFR2, FGFR3, FLCN, FLNA,*

FMN1, FN1, FOXI1, FOXP1, FRAS1, FREM1, FREM2, FUZ, FXYD2, G6PD, GANAB, GAPVD1, GATA3, GCM2, GDF11, GEMIN4, GLA, GLI3, GLIS2, GLIS3, GNA11, GPC3, GPHN, GREB1L, GRHRP, GRIPI, H19, HAAO, HAS2, HES7, HGD, HNF1A, HNF1B, HNF4A, HOGA1, HPRT1, HPSE2, HSD11B2, HSD17B4, HSPA9, IFT122, IFT140, IFT172, IFT27, IFT43, IFT46, IFT52, IFT74, IFT80, IFT81, INF2, INPP5E, INTU, INVS, IQCB1, IRF5, ITGA3, ITGA8, ITGAM, ITGB4, ITSN1, ITSN2, JAG1, JAM3, KANK1, KANK2, KANK4, KAT6B, KCNA1, KCNJ1, KCNJ10, KCNJ15, KCNJ16, KCTD1, KIAA0556, KIAA0586, KIAA0753, KIF14, KIF7, KLHL3, KMT2D, KYNU, LAGE3, LAMA5, LAMB2, LCAT, LMNA, LMX1B, LRIG2, LRP2, LRP4, LRP5, LYZ, LZTFL1, MAD2L2, MAFB, MAGED2, MAGI2, MAPKBPI, MBTPS2, MCM5, MKKS, MKS1, MMACHC, MNX1, MOCOS, MOCS1, MUC1, MYCN, MYH9, MYO1E, NAA10, NCAPG2, NDUFAF3, NDUFB8, NDUFS2, NEK1, NEK8, NEU1, NFIA, NIPBL, NOS1AP, NOTCH2, NPHP1, NPHP3, NPHP4, NPHS1, NPHS2, NR3C2, NRIP1, NSDHL, NUP107, NUP133, NUP160, NUP205, NUP85, NUP93, NXF5, NXN, OCRL, OFD1, OPLAH, OSGEP, PAX2, PAX8, PBX1, PCBD1, PCSK5, PDE6D, PDSS1, PDSS2, PEX1, PEX10, PEX11B, PEX12, PEX13, PEX14, PEX16, PEX19, PEX2, PEX26, PEX3, PEX5, PEX6, PGM3, PHEX, PHGDH, PIBF1, PIEZO2, PIGN, PIGT, PKD1, PKD2, PKHD1, PLA2R1, PLCE1, PMM2, PODXL, PORCN, PRKCD, PRKCSH, PRPS1, PTEN, PTPN22, PTPRO, PUF60, RAD21, RAI1, RARRES1, REN, RERE, RET, RFWD3, RMND1, RNU4ATAC, ROBO2, ROR2, RPGRIP1L, RPL26, SALL1, SALL4, SARS2, SCARB2, SCNN1A, SCNN1B, SCNN1G, SDCCAG8, SEC61A1, SEC61B, SEC63, SEMA3E, SF3B4, SGPL1, SI, SIX1, SIX2, SIX5, SLC12A1, SLC12A2, SLC12A3, SLC12A7, SLC22A12, SLC26A1, SLC26A7, SLC2A2, SLC2A9, SLC34A1, SLC34A3, SLC36A2, SLC3A1, SLC41A1, SLC4A1, SLC4A2, SLC4A4, SLC5A1, SLC5A2, SLC6A19, SLC6A20, SLC7A7, SLC7A9, SLC9A3R1, SLIT2, SMARCAL1, SNRPB, SON, SOX11, SOX17, SPRY2, SRGAP1, STAT1, STAT4, STK11, STRA6, STS, SUFU, SYNPO, TBCID24, TBCID8B, TBX18, TBX4, TBXT, TCTN1, TCTN2, TCTN3, TFAP2A, THBD, THOC6, TMEM107, TMEM138, TMEM216, TMEM231, TMEM237, TMEM260, TMEM67, TNFSF4, TNIP1, TNS2, TNXB, TP53RK, TP63, TPRKB, TRAF3IP1, TRAP1, TREX1, TRIM32, TRIP11, TRPC6, TRPM6, TRPS1, TRRAP, TSC1, TSC2, TTC21B, TTC37, TTC8, TXNDC15, TXNL4A, UMOD, UPK3A, USP8, VANGL1, VANGL2, VDR, VHL, VIPAS39, VPS33B, VTN, WDPCP, WDR19, WDR34, WDR35, WDR60, WDR72, WDR73, WFS1, WNK1, WNK4, WNT3, WNT4, WNT5A, WNT7A, WT1, XDH, XPNPEP3, XPO5, XRCC2, XRCC4, ZAP70, ZIC3, ZMPSTE24, ZNF148, ZNF365, ZNF423

Además, **Inherited NephroKitDx** incluye un total de 98 variantes intrónicas de interés, en los siguientes 32 genes.

BBS1, BBS4, CD46, CEP290, CFH, CLCN7, COL4A5, CPLANE1, CPT1A, CUBN, FLCN, FLNA, GLA, HNF1A, IRF5, JAM3, OCRL, PHEX, PKHD1, PMM2, SDCCAG8, SLC12A3, SLC2A9, SNRPB, TMEM107, TSC1, TSC2, TXNL4A, UBA5, UMOD, VHL, ZAP70

**Inherited NephroKitDx** está basado en tecnología de captura por sondas para capturar las regiones diana de estos 529 genes incluyendo todos los reactivos necesarios para la completa preparación de las librerías. Los resultados obtenidos en este ensayo proporcionarán al clínico las variantes de las regiones codificantes y variantes de *splicing* de los genes incluidos en el panel. Dicha información determinará la predisposición del paciente a padecer una patología renal.

Mediante el uso de **Inherited NephroKitDx** se podrán detectar SNVs, INDELS y CNVs a lo largo de los 529 genes incluidos. La detección de CNVs quedará fuera del alcance del mercado CE/IVD.

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

## 03 Características técnicas

**Inherited NephroKitDx** ha sido validado en la plataforma *NextSeq 500/550Dx System* de Illumina mediante el análisis de muestras de ADN de referencia procedentes de *Coriell Institute* y muestras de relevancia clínica previamente genotipadas con otras tecnologías. En dicha validación se ha verificado la detección específica de las variantes presentes en los genes seleccionados, así como la repetibilidad y reproducibilidad.

### Especificidades técnicas:

- ◇ Tipo de muestra: ADN procedente de sangre periférica.
- ◇ Cantidad de ADN necesario: 50-100 ng.
- ◇ Cobertura media: 1200X.
- ◇ Cobertura: 99.7% de las bases cubiertas a una profundidad de 50X.
- ◇ Uniformidad: 97.5% de las bases cubiertas a >20% de la media de cobertura.
- ◇ Especificidad: > 99 %
- ◇ Sensibilidad: > 99 %
- ◇ Repetibilidad: > 99 %
- ◇ 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 **Data Genomics**.



## 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.
- **Nephropathies 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	3 x 1 mL	4°C

Tabla 1. Reactivos de la caja 1 de Inherited NephroKitDx

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 NephroKitDx

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

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

Tabla 3. Reactivos de la caja 3 de Inherited NephroKitDx

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 NephroKitDx

**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:

- Termociclador con tapa con temperatura regulable
- 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 y tiras de 0.2mL; con velocidad regulable de al menos 1000 rpm)
- Centrifuga de placas
- 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)
- 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 NephroKitDx* 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. Estas referencias se encuentran disponibles bajo petición.

# 07 Protocolo de ensayo

Los reactivos incluidos en **Inherited NephroKitDx** 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 NephroKitDx**.

## 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*.

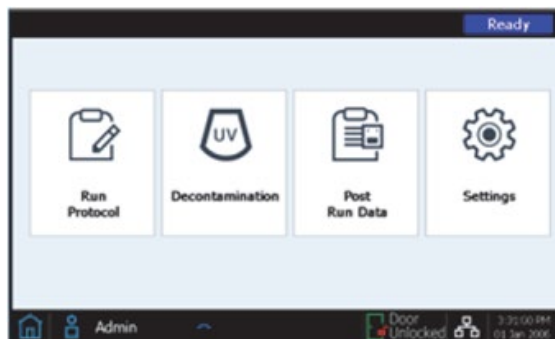


Figura 1. Pantalla Home del sistema Magnis NGS Prep

- ◇ 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 NephroKitDx**.

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 Diluir cada muestra de ADN a 30 ng/μL con agua libre de nucleasas en un volumen final de 25 μL.

**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 1.5 μL de agua libre de nucleasas, por la misma cantidad de un único reactivo de seguimiento por cada muestra.

- 04 Agitar en *vortex* y cuantificar de nuevo cada muestra con un equipo fluorométrico, como Qubit.
- 05 Diluir cada muestra de ADN con agua libre de nucleasas hasta obtener una cantidad de 100 ng totales, en un volumen final de 7 μL, en tira de pocillos de 0.2 mL.

En caso de no disponer de 100 ng totales en un volumen de 7  $\mu\text{L}$ , 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 50 ng totales. Si se elige esta opción se recomienda llevarlo a cabo para todas las muestras del *run* que no alcancen los 100 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.

- 06 Agitar todas las diluciones en *vortex*, dar un *spin* y mantener en frío hasta su uso en el siguiente apartado.

## 07.2.2 | Fragmentación del ADN

En este apartado, el ADN se fragmentará enzimáticamente, con el objetivo de obtener fragmentos de ADN de un tamaño entre 200 y 300 pb.

Reactivos a utilizar en este apartado:

Reactivo	Color	Conservación
<b>Fragmentation Buffer</b>	Tapón verde	-20°C
<b>Fragmentation Enzyme</b>	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 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 $\mu\text{L}$	18 $\mu\text{L}$
Fragmentation Enzyme	1 $\mu\text{L}$	9 $\mu\text{L}$



- 03 Agitar vigorosamente en *vortex*.
- 04 Dispensar 3 µL del mix de fragmentación a cada pocillo de 0.2 mL con la muestra fragmentada. Mezclar pipeteando 20 veces.
- 05 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.
  - ◇ Volumen de reacción 10 µL.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
37°C	10 minutos	1
65°C	5 minutos	1
4°C	∞	

Tabla 5. 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.

- 06 Cuando acabe el programa de fragmentación, extraer las muestras del termociclador, dar un spin, añadir agua libre de nucleasas a cada muestra hasta un volumen final 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:** Si se duplica el volumen de fragmentación, se debe tener en cuenta a la hora de llevar el volumen final hasta el total de 50 µL.

**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*.

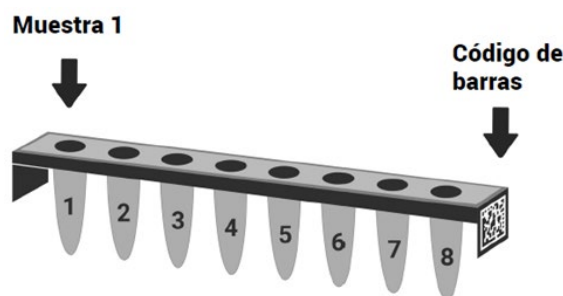


Figura 3. Orientación requerida de las muestras en la *Sample Input Strip*

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

Reactivos a utilizar en este apartado:

Reactivo	Color	Conservación
<b>Reagents Plate</b>	Placa azul	-20°C
<b>Beads and Buffer Plate</b>	Placa blanca	4°C
<b>Index Strip</b>	Tira negra	-20°C
<b>Nephropathies Probe Strip</b>	Tira blanca	-80°C
<b>Caja 4</b>	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	ACCTCAA	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.

Nº 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 *Nephropathies 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.

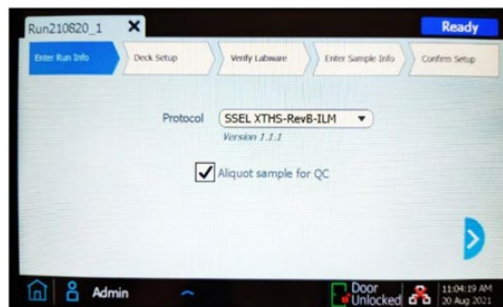


Figura 4. Pantalla Enter Run Info del sistema Magnis NGS Prep

- 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 NephroKitDx**, se recomienda la cantidad de 100 ng. Cambiar la cantidad de ADN en caso de haber partido de otra cantidad (mínima de 50 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 una 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 Cycler 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 fijas 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.

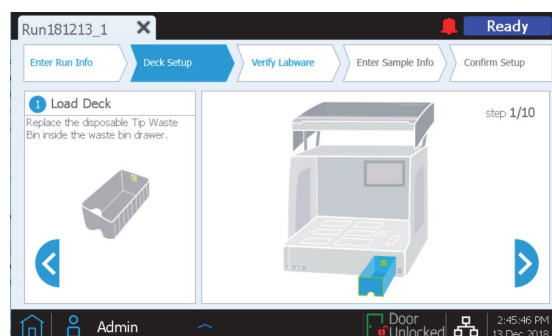


Figura 6. Paso 1 de 10 de la pantalla Deck Setup del equipo Magnis NGS Prep

- 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.

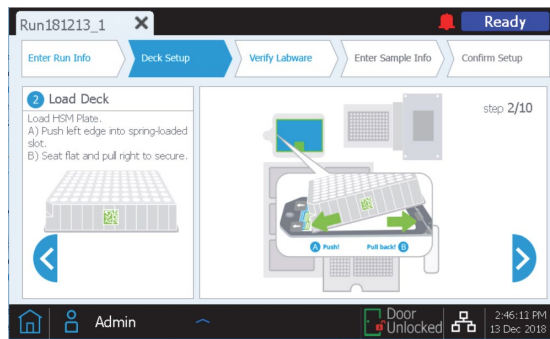


Figura 7. Paso 2 de 10 de la pantalla Deck Setup del equipo Magnis NGS Prep

- 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.

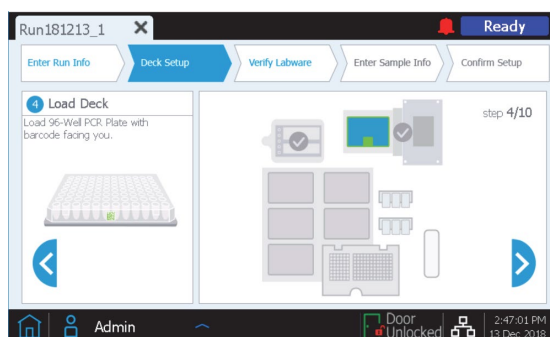


Figura 9. Paso 4 de 10 de la pantalla Deck Setup del equipo Magnis NGS Prep

- 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.

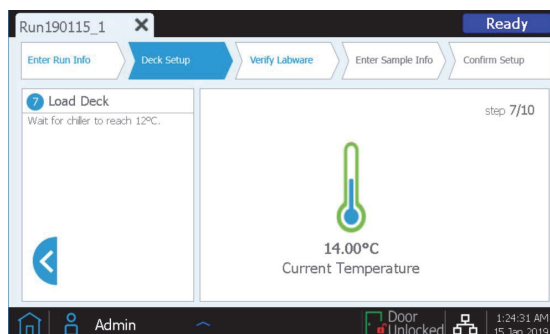


Figura 12. Paso 7 de 10 de la pantalla Deck Setup del equipo Magnis NGS Prep

- 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 *Nephropathies 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.

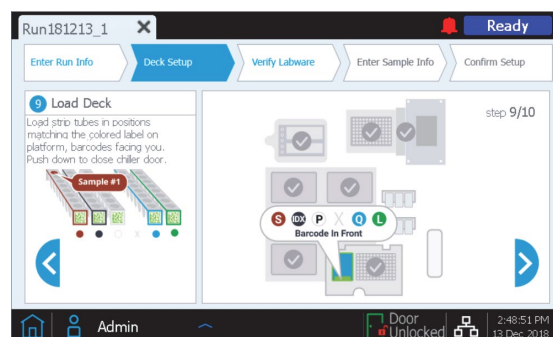


Figura 14. Paso 9 de 10 de la pantalla Deck Setup del equipo Magnis NGS Prep

10 Cerrar la puerta del instrumento.

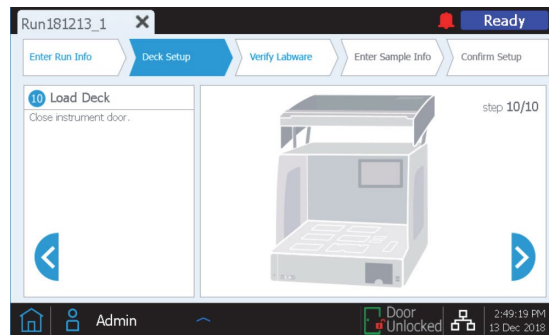


Figura 15. Paso 10 de 10 de la pantalla Deck Setup del equipo Magnis NGS Prep

### 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.

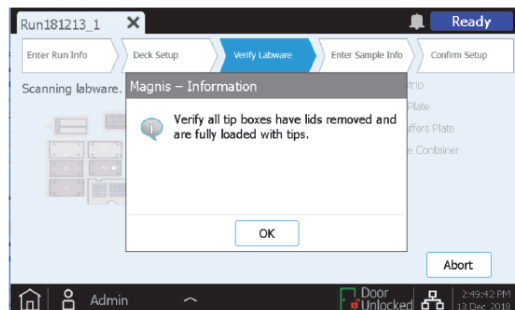


Figura 16. Ventana emergente de la pantalla Verify Labware del equipo Magnis NGS Prep

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.

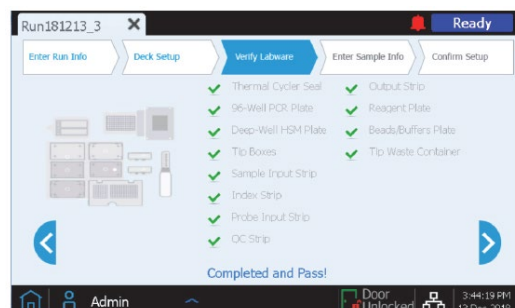


Figura 17. Pantalla Verify Labware del equipo Magnis NGS Prep, tras una verificación correcta del material

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.

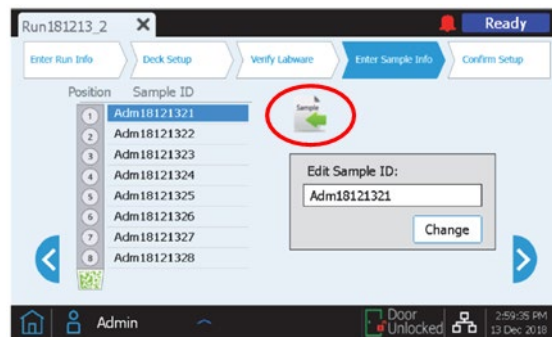


Figura 18. Pantalla *Edit Sample Info* del equipo Magnis NGS Prep, destacando con una circunferencia el botón de carga de muestras.

##### 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 NephroKitDx.

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.

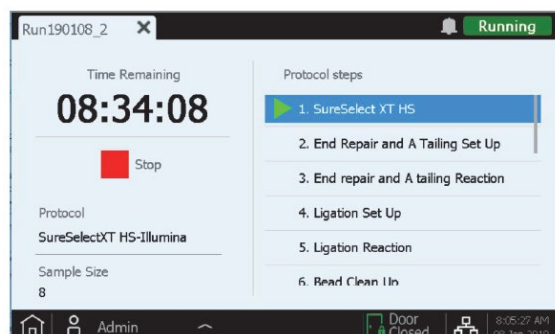


Figura 20. Pantalla *Running* durante un ensayo

## 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.

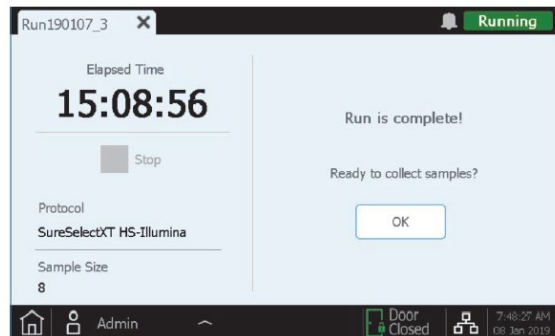


Figura 21. Pantalla Running tras un ensayo

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 24 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:

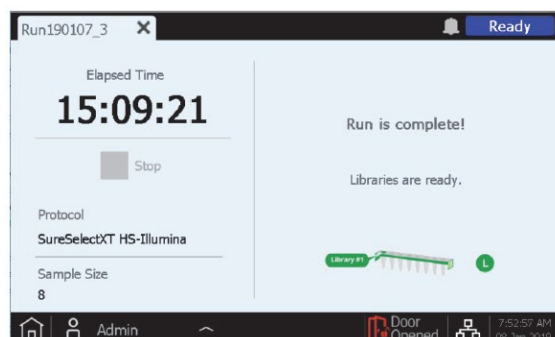


Figura 22. Pantalla Running tras un ensayo y con las librerías ya recogidas

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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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 **300-400 bp** (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.

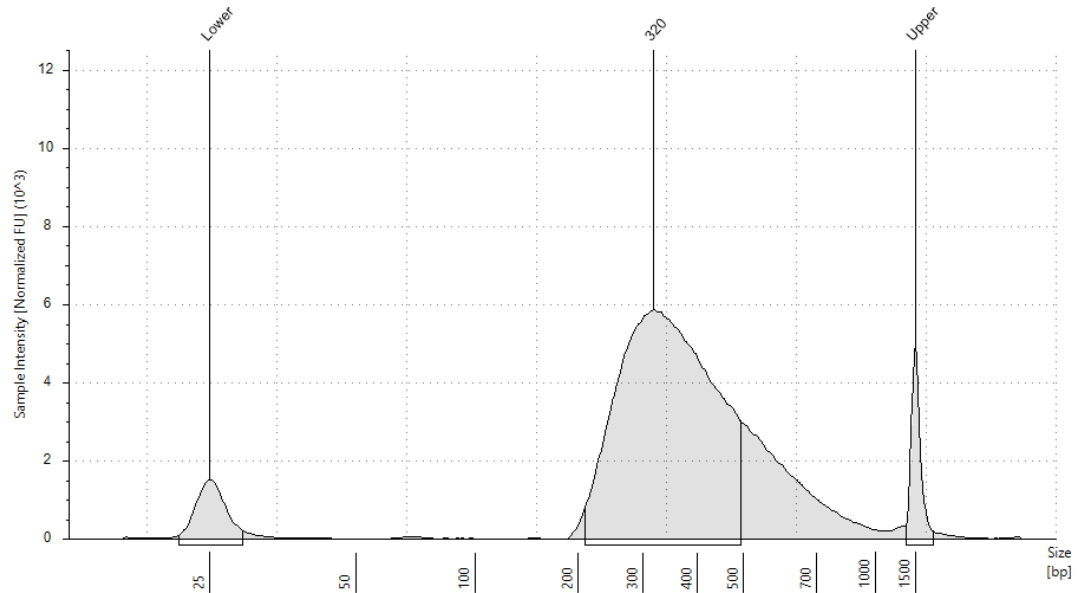


Figura 23. Resultado esperado tras el análisis de tamaño de las librerías pre-captura con TapeStation System

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 **310 y 390 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.



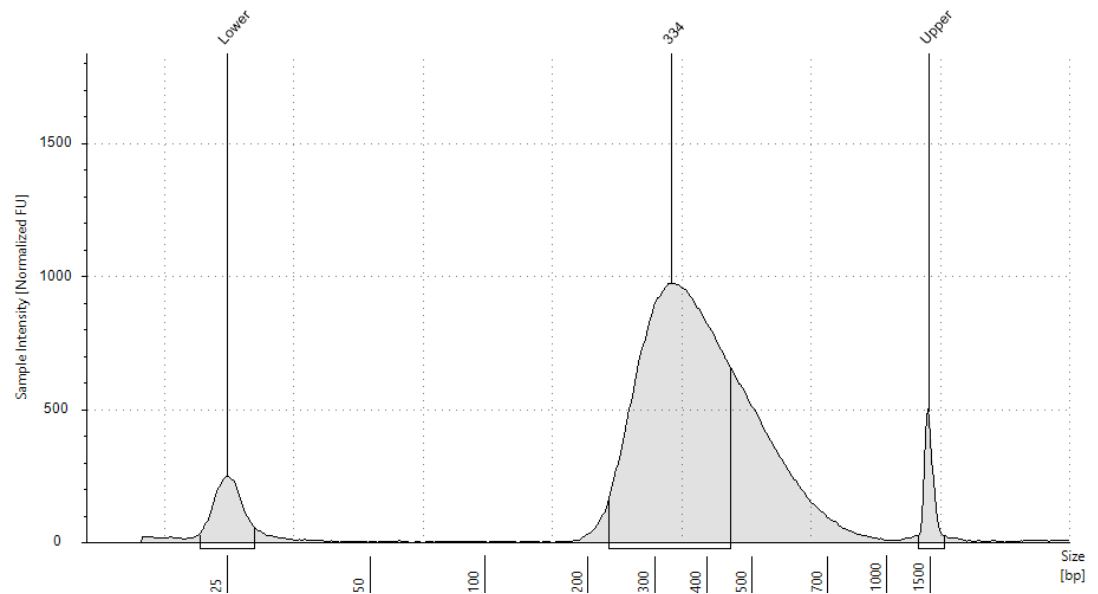


Figura 24. Resultado esperado tras el análisis de tamaño de las librerías post-captura con TapeStation System

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. El *PhiX control* debe estar desnaturalizado y diluido a 20 pM.

**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  $\mu\text{L}$  del *pool* de librerías, diluido previamente a 4 nM, a un tubo de 1.5 mL y 5  $\mu\text{L}$  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 20 millones por muestra:

NextSeq Reagents Kit	Nº máximo de muestras
NextSeq 500/550 Mid Output v2.5 kit (300 cycles) Ref: 20024905	8
NextSeq 500/550 High Output v2.5 kit (300 cycles) Ref: 20024908	24

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

**IMPORTANTE:** Si se secuencian menos muestras de las recomendadas aumentará la profundidad de la lectura, pudiendo disminuir la sensibilidad de este kit en el análisis de Alus, fusiones y CNVs al aparecer más falsos positivos. Se recomienda revisar el fichero de alineamiento .bam en estos casos.

## 07.8 | Configuración de la plataforma NextSeq

- 01 Configurar la plataforma ejecutando el modo independiente ("*Stand-alone*"), ya que *BaseSpace* actualmente no admite la secuenciación del "*molecular barcode*" como *index*.
- 02 Seguir las instrucciones de carga del equipo.
- 03 Al finalizar la carga, aparecerá la pantalla de configuración de la carrera. Introducir los siguientes parámetros:
  - ◇ *Read Type: Paired End.*
  - ◇ *Cycles:*
    - ↳ *Read 1: 150*
    - ↳ *Read 2: 150*
    - ↳ *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 NephroKitDx**, a través de la plataforma **Data Genomics**. El acceso a esta herramienta se realiza a través de: [www.datagenomics.es](http://www.datagenomics.es).

La herramienta permite llevar a cabo el análisis de las diferentes muestras y obtener todos los ficheros generados tras el análisis bioinformático de las mismas.

Ya que la tecnología NGS todavía no se considera la técnica *Gold Standard* para algunos tipos de mutación, se recomienda, siempre que sea posible, confirmar los resultados positivos mediante una tecnología complementaria y estandarizada.

### 08.1 | Solicitud de análisis

- 01 Seleccionar “*Import Samples*” en la pantalla principal (pestaña de *Orders*) para iniciar el análisis de las muestras secuenciadas. De esta forma se accede a la pantalla de importación de ficheros (Figura 25). En dicha pantalla se deben importar los 12 ficheros *FastQ* asociados a cada muestra y opcionalmente, el fichero de la *SampleSheet*, que permitiría importar todos los ficheros del mismo run de secuenciación simultáneamente.

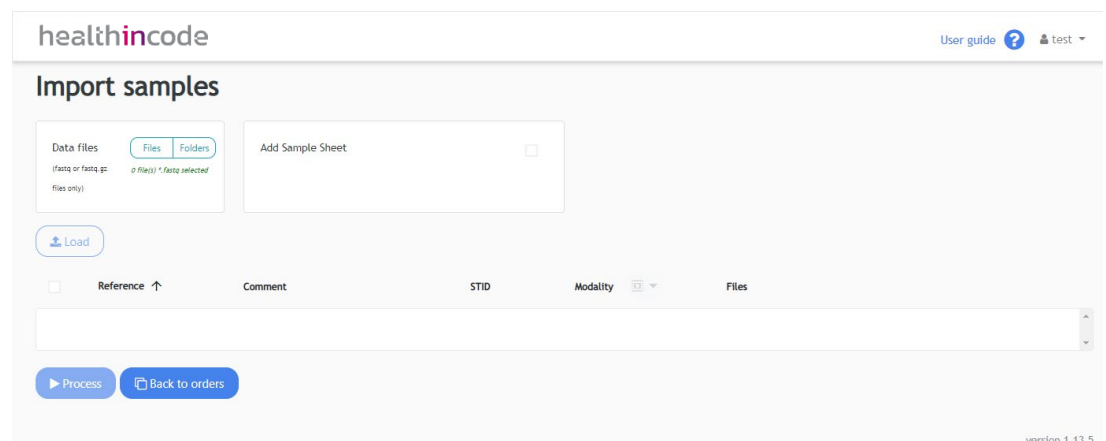


Figura 25. Pantalla para importar los ficheros *FastQ* y la *SampleSheet* e iniciar la solicitud de análisis

- 02 Una vez cargados los ficheros, se deberá indicar el nombre del run de secuenciación y seleccionar la modalidad de estudio, *Inherited NephroKitDx*, y el *STID* (*Sample Tracking ID*) usado en cada muestra (o “*no stid*”, en caso de no haber usado ninguno).
- 03 Para llevar a cabo la solicitud de análisis, seleccionar las muestras que se quieran analizar y accionar el botón de “*Process*”. Cuando haya finalizado el proceso con éxito aparecerá el mensaje: **✓ La importación se ha realizado correctamente.**
- 04 Seleccionar “*Back to orders*” para regresar a la pantalla principal.

## 08.2 | Gestión de solicitudes

Todas las solicitudes creadas aparecerán en la pestaña de *Orders* dentro del correspondiente apartado según el estado en el que se encuentran (*In bioinformatic process, Pending, In review, Finished, Cancelled*). En la solicitud se mostrará el nombre de la muestra, la modalidad y el estado del análisis.

Pulsando sobre la muestra se accede a una pantalla en la que se pueden anotar y guardar determinadas características de cada muestra, como fechas de recepción, indicación clínica, etc.

Para acceder a los resultados del análisis bioinformático, en la petición *bioinformatics* y seleccionando *Show results*, se abrirá la ventana *Workspace*. Esta pantalla pone a disposición del usuario los ficheros resultantes del análisis bioinformático: ficheros de alineamiento (bam y bai), listado de variantes (vcf), así como otros ficheros con información sobre coberturas y el informe de calidad de la secuenciación tras el análisis bioinformático. En la petición *CNV*, seleccionando *Show results* se puede acceder a los ficheros resultantes del análisis de CNVs por gen (*\_calls.tsv*, *images\_cnv.zip* y *\_sample\_QC.tsv*).

Los parámetros tenidos en cuenta en los diferentes archivos generados de la secuenciación para que una muestra pase el control de calidad bioinformático establecido para el ensayo de **Inherited NephroKitDx** son:

- **FASTQ**: Los criterios establecidos de aceptación se encuentran detallados en las instrucciones de uso de **Data Genomics**, disponibles en: [www.datagenomics.es](http://www.datagenomics.es).
- **BAMs**:
  - ◇ *On-target (%)*:
    - ↳ Fail:  $\leq 82$
    - ↳ Warn: 82–83.5
    - ↳ Pass:  $\geq 83.5$
  - ◇ *DP50 (%)*:
    - ↳ Fail:  $\leq 98$
    - ↳ Warn: 98 – 99.3
    - ↳ Pass:  $\geq 99.3$
  - ◇ *Uniformity 50% (%)*:
    - ↳ Fail:  $\leq 81.5$
    - ↳ Warn: 81.5 –84.5
    - ↳ Pass:  $\geq 84.5$
- **STIDs**: Comprobación de que el reactivo de trazabilidad obtenido coincida con el esperado (en caso de haber sido usado), como se muestra en la figura 26.

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

En el ensayo **Inherited NephroKitDx** no se tiene en cuenta para el control de calidad los archivos VCF, ya que se trata de un panel demasiado pequeño como para ser representativo y constante.

Feature	Obtained	Expected	Status
STID	1011	1011	PASS
Gender	Mujer	Mujer	PASS

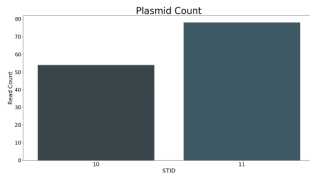


Figura 26 . Control de calidad del sistema integrado de trazabilidad

Para acceder al filtrado de variantes, en la petición “Filtering” se aplicará el filtro *Inherited NephroKitDx Default*, el cual se caracteriza por:

- ◇ Variantes de calidad: *PASS; d50; pseudogenic\_homology; LowMappeabilityRegion; hotspot (Fault summary)*.
- ◇ Profundidad:  $\geq 20X$  (*Clean total count*).
- ◇ Frecuencia alélica:  $\geq 20\%$  (*Variant Freq*).
- ◇ Distancia al exón: *20 (Exon distance)*.

**NOTA:** Las variantes intrónicas presentes en las regiones diseñadas por su implicación clínica poseerán la *flag Hotspots* y podrán observarse con este filtro a pesar de estar a más de 20 pb del exón.

## 08.3 | Análisis de grandes reordenamientos (CNVs)

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

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:

- ◇ 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.
- ◇ 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.

**Inherited NephroKitDx** ofrece un análisis de CNVs que puedan afectar a uno o varios exones de un gen o a un gen completo incluido en el panel (*CNVs per gene*).

Para analizar los resultados de CNVs con **Data Genomics**, se accederá a los resultados de la petición “Filtering” y en concreto a la pestaña CNVs.

**Data Genomics** integra un sistema de alertas para avisar al usuario acerca de la fiabilidad de los resultados en base a los parámetros de calidad de la muestra. De acuerdo con estos parámetros los resultados se considerarán fiables (*High confidence*), de credibilidad intermedia (*Medium confidence*) o de baja credibilidad (*Low confidence*). Los parámetros tenidos en cuenta son los siguientes: similitud con las muestras de la referencia, *z-score* y ratio, cobertura media, número de muestras de la referencia que se seleccionan para el análisis, uniformidad entre las muestras de la misma tanda y número de CNVs detectadas antes del filtrado de variantes.

Respecto al resultado de CNVs, se mostrarán por defecto las variantes PASS. Éstas serán las variantes de mayor calidad, que tengan un p-valor  $\leq 0.0005$  y una ratio  $\leq 0.7$  o  $\geq 1.3$ . Algunas de estas variantes podrán salir con una o varias de las siguientes *flags*:

- **"High Controls Variation"**: indica que existe una alta variación de coberturas dentro del grupo de referencias comparado con la muestra problema.
- **"Low Zeta score"**: el valor *z-score* indica cuántas desviaciones estándar se aleja el evento identificado de la media de la población. Esta *flag* indica que el evento identificado tiene un promedio bajo del valor de *z-score* y, por tanto, que su desviación típica no se aleja demasiado de la media. Al tratarse de CNVs, estos valores se basan en las coberturas obtenidas para cada región.

Como se ha mencionado anteriormente, el cálculo de CNVs radica en la profundidad de cobertura de cada muestra. La tecnología NGS tiene ciertas limitaciones intrínsecas, por ejemplo, la homología entre regiones y la existencia de pseudogenes puede afectar a la mapeabilidad de las regiones de interés. En este sentido, el **Inherited NephroKitDx** contiene genes complejos de analizar por su homología a otros genes o regiones como, por ejemplo, *PKD1*, *PKD2*, *C4A* y *C4B*. Asimismo, este kit contiene los genes *CFHR1* y *CFHR3*, cuya delección es frecuente en la población occidental. Teniendo en cuenta el diseño y la naturaleza del panel, genes con CNVs poblacionales o con problemas de mapeabilidad pueden generar el llamamiento de las *flags* arriba mencionadas siendo verdaderos positivos.

Por otro lado, en los filtros el usuario podrá elegir la opción de mostrar todas las variantes llamadas sin ningún tipo de pre-filtrado por calidad clicando en la opción **"No Pass"**.

Si el análisis de CNVs no se ha podido llevar a cabo aparecerá una alerta en **Data Genomics** indicando el motivo.

**Data Genomics** ofrece una representación gráfica (Figura 27) de los perfiles de cobertura de la muestra frente a las muestras de la referencia. Este gráfico permite visualizar los SNPs e INDELS presentes en las regiones analizadas.

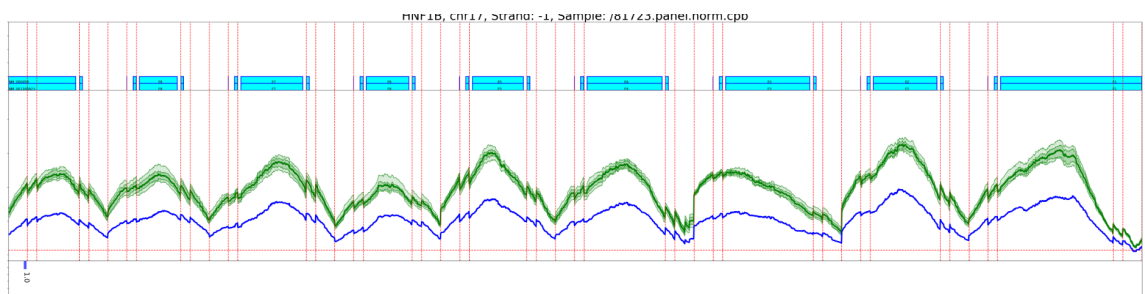


Figura 27. Resultados de CNVs mostrados en la plataforma **Data Genomics**

## 08.4 | Filtrado de variantes

Seleccionando el botón “Request: Filtering” se accederá a una pantalla emergente con los distintos análisis de variantes generados hasta el momento.

Gene	Exon	Zygosity	Variant Freq	Prod. Effect	cHaps	pHaps	dbSNP ID	Clinical Sign	Own Freq	Category	HC Germline Db	Actions
DVL1	4/15	HOMZ_ALT	0.98900	synonymous_variant	c366A>G	p.P122P	rs307362		0.9993	+	-	IKV G vS
DVL1	4/15	HOMZ_ALT	0.98900	synonymous_variant	c366A>G	p.P122P	rs307362		0.9993	B	B	IKV G vS
DVL1	4/15	HOMZ_ALT	0.98900	synonymous_variant	c366A>G	p.P122P	rs307362		0.9993	+	-	IKV G vS
DVL1	4/15	HOMZ_ALT	0.98900	synonymous_variant	c366A>G	p.P122P	rs307362		0.9993	+	-	IKV G vS
DVL1	4/15	HOMZ_ALT	0.98900	synonymous_variant	c366A>G	p.P122P	rs307362		0.9993	+	-	IKV G vS
DVL1	4/19	HOMZ_ALT	0.98900	synonymous_variant	c366A>G	p.P122P	rs307362		0.9993	+	-	IKV G vS
		HOMZ_ALT	0.99200	regulatory_region_var			rs90769461		0.2571	+	-	IKV G vS
PEX10	5/6	HETZ	0.47500	missense_variant	c.820A>G	p.T274A	rs3454371	BENIGN/LIKELY_BEN	0.0295	+	-	IKV G vS
PEX10	5/6	HETZ	0.47500	missense_variant	c.820A>G	p.T294A	rs3454371	BENIGN/LIKELY_BEN	0.0295	PR	PR	IKV G vS
PEX10	3/6	HOMZ_ALT	0.99700	synonymous_variant	c.251A>G	p.T37T	rs2494598	BENIGN	0.77979	+	-	IKV G vS
PEX10	3/6	HOMZ_ALT	0.99700	synonymous_variant	c.251A>G	p.T37T	rs2494598	BENIGN	0.77979	+	-	IKV G vS
CEPD4		HOMZ_ALT	0.99900	splice_region_variant	c.1835c7A>G		rs443779		0.93720	+	-	IKV G vS
CEPD4		HOMZ_ALT	0.99900	splice_region_variant	c.1944c7A>G		rs443779		0.93720	+	-	IKV G vS
CEPD4	10/22	HETZ	0.46000	missense_variant	c.1240T>A	p.L41E	rs2275653		0.44092	+	-	IKV G vS
CEPD4	10/22	HETZ	0.46000	missense_variant	c.1348T>A	p.L450I	rs2275624		0.44092	+	-	IKV G vS
		HOMZ_ALT	1.00000	synonymous_variant	c.744A>G	p.E24E	rs93944		0.93454	B	B	IKV G vS

Figura 28. Filtrado de variantes con Data Genomics

Al acceder al análisis de variantes, aparecerán las variantes que hayan superado los criterios del filtro *Inherited NephroKitDx Default*, cuyo objetivo es mostrar las variantes de mejor calidad dentro de las regiones diana de *Inherited NephroKitDx*.

Una vez revisadas y categorizadas las variantes mostradas con el filtro anterior, se recomienda aplicar un segundo filtro, que deberá generar el usuario, en el que se muestren todas las variantes catalogadas por *Clinvar* como patogénicas o posiblemente patogénicas, a pesar de que no cumplan los criterios especificados en el filtro *Inherited NephroKitDx Default*. De esta forma se mostrarán variantes que, independientemente de su calidad, tienen implicaciones clínicas. Si mediante el uso de este filtro son detectadas variantes de interés de baja calidad, Health in Code, S.L. recomienda su confirmación con otra tecnología.

La creación de nuevos filtros se lleva a cabo accionando el botón “Filters” desde la pantalla “Variants”. Aparece entonces, una ventana emergente desde la que se puede crear el filtro nuevo. Para ello habrá que ajustar las diferentes opciones a lo deseado por el usuario. Una vez se hallan elegido las características del filtro, se puede guardar (Save) y aplicar a la muestra actual seleccionando “Apply”.

Cada variante hallada llevará asociada una etiqueta de calidad en la columna “Fault summary”. Las posibles etiquetas, así como su descripción y toda la información aportada por el filtrado de variantes, se encuentra detallada en las instrucciones de uso de **Data Genomics**, disponibles en: [www.datagenomics.es](http://www.datagenomics.es).

### 08.6.1 | Categorización de variantes SNVs e INDELS, CNVs y SVs

Una vez se hayan llevado a cabo los filtros deseados por el usuario, cada variante hallada, ya sean variantes puntuales, pequeñas deleciones e inserciones o CNVs, puede ser categorizada.



Pinchando en la columna "Category", sobre cada variante, aparece un desplegable con las diferentes categorías a las que se puede asociar la variante, entre las que se encuentran: patogénica (P), probablemente patogénica (LP), variante de significado incierto (VUS), probablemente benigna (LB) o benigna (B).

### Category

The form contains the following fields:

- Category: A dropdown menu with 'Benigna' selected.
- User Modifier: A greyed-out text input field.
- Commentary: A large text area with a diagonal icon in the bottom right corner.
- Reference: A text input field with a diagonal icon in the bottom right corner.
- Date: A greyed-out text input field.
- Verified: A checkbox.
- Verifier user: A greyed-out text input field.
- Date of verification: A text input field with a calendar icon.
- Verification comment: A text input field.

At the bottom of the form, there are three buttons: 'Historical' (grey), 'Cancel' (grey), and 'Accept' (purple with a white checkmark).

Figura 29. Desplegable de la columna "Category"

En caso de no querer evaluar la variante o si se sospecha que se trata de un falso positivo, se recomienda categorizarla como "no evaluable/artefacto" que, de ser seleccionada, impediría cualquier selección adicional.

Health in Code, S.L. aportará, en la columna *HIC Germinal Db*, la categorización de las variantes considerando el impacto funcional que causaría la variante a nivel biológico.

Tras el análisis de las muestras, es posible generar un archivo de las variantes seleccionadas, ya sea como csv o emitir un informe automático en pdf. Para ello, se accionará el botón "Report" y se finalizará el análisis tras una última revisión de las variantes seleccionadas para incluirlas en el informe. Para cualquier duda sobre el análisis de resultados contacte con el soporte técnico de Health in Code, S.L., y su incidencia quedará resuelta en un plazo de 24 horas.

Para cualquier duda sobre el análisis de resultados contacte con el departamento técnico de Health in Code, S.L..

## 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 NephroKitDx**. 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*.

- + **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.

- + **Tamaños superiores a los esperados tras la fragmentación 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.

- + **El tamaño de las librerías es mayor de lo esperado en los electroferogramas:**

Verificar el correcto desarrollo del protocolo de fragmentación enzimática (apartado 7 de este documento).

Considerar la repetición del experimento con un ADN de control para verificar que las muestras experimentales no contienen inhibidores de la reacción de fragmentación.

- + **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.

# 10 Limitaciones

## 10.1 | Analíticas

- ◇ **Inherited NephroKitDx** 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 permite distinguir entre regiones 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 NephroKitDx** con una homología del 100% con regiones pseudogénicas aparecen listadas a continuación. En el análisis de resultados, en la columna “*Fault summary*” aparecerá la etiqueta “*Pseudogenic\_homology*”, cuando se detecte una variante en una región de homología con pseudogenes.

Cromosoma	Posición de inicio	Posición final	Gen	Exón	Secuencia de referencia
6	31976379	31976502	CYP21A1P	EX8	NR_040090.1
6	31976379	31976502	TNXA	EX13	NR_001284.2
6	31976801	31976986	TNXA	EX12	NR_001284.2
6	31977042	31977225	TNXA	EX11	NR_001284.2
6	31977296	31977414	TNXA	EX10	NR_001284.2
6	31977486	31977659	TNXA	EX9	NR_001284.2
6	31977730	31977884	TNXA	EX8	NR_001284.2
6	31977982	31978134	TNXA	EX7	NR_001284.2
6	31978206	31978371	TNXA	EX6	NR_001284.2
6	31978468	31978610	TNXA	EX5	NR_001284.2
6	31978750	31978825	TNXA	EX4	NR_001284.2
6	31978918	31979062	TNXA	EX3	NR_001284.2

6	31979292	31979649	TNXA	EX2	NR_001284.2
6	31979917	31980152	TNXA	EX1	NR_001284.2
6	32009114	32009237	CYP21A2	EX10	NM_000500.9
6	32009114	32009237	TNXB	EX44	NM_019105.8
6	32009536	32009721	TNXB	EX43	NM_019105.8
6	32009777	32009960	TNXB	EX42	NM_019105.8
6	32010031	32010149	TNXB	EX41	NM_019105.8
6	32010296	32010393	TNXB	EX40	NM_019105.8
6	32010464	32010618	TNXB	EX39	NM_019105.8
6	32010716	32010868	TNXB	EX38	NM_019105.8
6	32010940	32011105	TNXB	EX37	NM_019105.8
6	32011202	32011343	TNXB	EX36	NM_019105.8
6	32011782	32011916	TNXB	EX34	NM_019105.8
6	32012146	32012503	TNXB	EX33	NM_019105.8
6	32012771	32012846	TNXB	EX32	NM_019105.8
6	32012941	32013113	TNXB	EX32	NM_019105.8
16	2151985	2151987	PKD1	IN26	NM_000296.4
16	2152226	2152307	PKD1	EX26	NM_000296.4
16	2167646	2167996	PKD1	EX6	NM_000296.4
16	75579261	75579403	TMEM231	EX3	NM_001077416.2
16	75579712	75579862	TMEM231	EX2	NM_001077416.2

Tabla 10. Listado de regiones pseudogénicas. \*IN=Intrón

- ◇ 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 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 NephroKitDx** ha sido validado usando el siguiente termociclador para la fragmentación del ADN.

### + **GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)**

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 NephroKitDx** ha sido validado usando el siguiente equipo automatizado de preparación de librerías:

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

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

+ **NextSeq 500/550 Dx 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 500/550Dx System*, la concentración final de las librerías tendrá que ajustarse a las especificaciones de los protocolos específicos de dichas plataformas.

## 10.3 | Reactivos

**Inherited NephroKitDx** 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 departamento técnico de Health in Code, S.L.

## 10.4 | Plataforma de análisis bioinformático

**Inherited NephroKitDx** ha sido validado empleando **Data Genomics**, plataforma de análisis bioinformático para diagnóstico *in vitro*. Dicha plataforma incluye una *pipeline* de análisis diseñada especialmente para **Inherited NephroKitDx**, 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 nuestro Departamento Técnico para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos:

✉ [tech.support@healthincode.com](mailto:tech.support@healthincode.com)

☎ +34 963 212 340

# healthincode



Conoce todos nuestros  
kits de diagnóstico

