



Instrucciones de uso

TP53 OncoKitDx

Ref. IMG-317



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.02

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.

Nuestros productos están diseñados para diagnóstico *in vitro*. 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.

Todos los productos comercializados por Health in Code S.L. son sometidos a un riguroso control de calidad. **TP53 OncoKitDx** ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada ensayo.

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

Modificaciones de las instrucciones de Uso (IFU)

Versión 09	DIC 2023	Revisión y actualización del apartado "3. Características técnicas".
Versión 08	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 07	SEP 2022	Cambio de la identificación del fabricante: de Imegen a HEALTH IN CODE, S.L.
Versión 06	NOV 2021	Revisión del contenido.
Versión 05	ABR 2021	Modificación del contenido del reactivo TP53 Index.
Versión 04	ENE 2021	Actualización del apartado 7.4
Versión 03	MAR 2020	Actualización de los apartados 4, 7.4 y 10.
Versión 02	JUL 2018	Actualización por marcado CE-IVD del producto.

índice

01	Información general	4
02	Uso previsto	5
03	Características técnicas	6
04	Advertencias y precauciones de seguridad	7
05	Contenido y condiciones de almacenamiento del kit	8
06	Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran	9
07	Protocolo de ensayo	10
07.1	Preparación de la primera reacción de amplificación	10
07.2	Preparación de la segunda reacción de amplificación	11
07.3	Purificación de los productos de PCR	12
07.4	Preparación de las librerías para la secuenciación	13
08	Análisis de los resultados	16
08.1	Solicitud de análisis	16
08.2	Gestión de solicitudes	17
08.3	Filtrado de variantes	18
09	Troubleshooting	19
10	Limitaciones	20
10.1	Equipos	20
10.2	Reactivos	20
10.3	Plataforma de análisis bioinformático	20
10.5	Estabilidad del producto	21
A.I	Apéndice I	22

01 Información general

El término cáncer hace referencia a un grupo muy amplio y variado de enfermedades que se caracterizan por un crecimiento descontrolado de células que pueden diseminarse a tejidos de otras partes del cuerpo. Las causas que desencadenan la aparición del cáncer son muy variadas y, con frecuencia, son el resultado de la interacción de un número elevado de factores de riesgo. Estos factores de riesgo provocan variaciones en los genes y en el genoma, que dan lugar a una pérdida del control de determinados procesos biológicos, que dan lugar a un crecimiento celular descontrolado.

El factor de transcripción p53 responde a diversas tensiones celulares regulando genes diana que inducen detención del ciclo celular, apoptosis, senescencia, reparación del ADN o cambios en el metabolismo. En las células no estresadas, p53 se mantiene inactiva esencialmente a través de las acciones de la ubiquitina ligasa MDM2. Numerosas modificaciones postraduccionales modulan la actividad de p53, especialmente la fosforilación y la acetilación. Varias isoformas de p53 menos abundantes, también modulan la actividad de p53. La actividad de p53 se pierde de manera ubicua en el cáncer humano ya sea por la mutación del propio gen *TP53* o por la pérdida de señalización celular aguas arriba o aguas abajo.

Mutaciones somáticas en el gen *TP53* son unas de las alteraciones más frecuentes en los cánceres humanos, como en Leucemia Linfoide Crónica (LLC), donde *TP53* es un factor pronóstico importante, y la evaluación de su estatus mutacional, acompañado de un análisis citogenético, son altamente recomendados antes de iniciar cualquier tratamiento. Además, mutaciones germinales de *TP53* son la causa subyacente del Síndrome de Li-Fraumeni, el cual predispone a un amplio espectro de cánceres de aparición temprana.

Más del 75% de las mutaciones dan lugar a la expresión de una proteína p53 que ha perdido, en la mayoría de los casos, sus funciones normales, y puede ejercer una regulación dominante negativa sobre el resto de proteínas p53 normales.

La mayoría de las mutaciones en el gen *TP53* son sustituciones de una única base distribuidas a lo largo de la secuencia codificante. Los diversos tipos y posiciones de las mutaciones pueden informar sobre la naturaleza de los mecanismos involucrados en la etiología del cáncer. Las mutaciones en *TP53* constituyen también un potencial marcador pronóstico y predictivo, así como dianas de intervención farmacológica.

Referencias

- > Muller PAJ et al. *Nat Cell Biol.* (2013)
- > Strano S et al. *Head Neck.* (2007)
- > Petijean A et al. *Hum Mutat.* (2007)
- > Liu DP et al. *Oncogene* (2010)
- > *NCCN guidelines CLL.* (2018)

02 Uso previsto

TP53 OncoKitDx ha sido diseñado para identificar mutaciones puntuales y pequeñas inserciones y deleciones en las regiones codificantes y en los sitios de *splicing* a lo largo del gen *TP53*, así como en el promotor (5'UTR), y las regiones no codificantes, presentes en el exón 1 y 2.

Debido a la alta frecuencia con la que aparece mutado *TP53* en diferentes tumores, **TP53 OncoKitDx** está optimizado para detectar mutaciones germinales y somáticas en el ADN procedente tanto de sangre periférica como de tejido tumoral. Todo ello mediante PCRs multiplexadas y posterior secuenciación con plataformas NGS, tecnología de secuenciación masiva de alto rendimiento.

TP53 OncoKitDx es sólo para uso en diagnóstico *in vitro* y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.

03 Características técnicas

Este kit ha sido validado utilizando muestras de ADN de referencia y muestras previamente genotipadas con otras tecnologías. En dicha validación se ha comprobado que se detectan de manera específica las variantes presentes en las regiones diana del producto, especificadas en el apartado 2 de este documento, y que dicho análisis fuera reproducible.

Especificidades técnicas:

- ◇ Tipo de muestra: ADN procedente de sangre periférica, tejidos embebidos en parafina, tejido fresco o congelado.
- ◇ Cantidad de ADN de partida: 40 ng.
- ◇ Cobertura: 99,4% de las bases cubiertas a una profundidad de 500X y 98,5% de las bases cubiertas a una profundidad de 1000X.
- ◇ Uniformidad: 100% de las bases cubiertas a >20% de la media de cobertura.
- ◇ Sensibilidad y especificidad: >99,9%
- ◇ Límite de detección: 2,5%.

NOTA: Fuera del alcance del marcado CE, **TP53 OncoKitDx** puede llegar a detectar mutaciones con frecuencias alélicas del 1%, con una especificidad analítica del 98%. Para estos casos recomendamos, con el fin de descartar falsos positivos, el análisis de las muestras por triplicado para asegurar la especificidad analítica de las variantes detectadas con frecuencias inferiores al 2,5%.

TP53 OncoKitDx es compatible con plataformas de secuenciación masiva de **Illumina**.

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.
- ◇ Los reactivos incluidos en este kit no son tóxicos, explosivos, infecciosos, radiactivos, magnéticos, corrosivos ni causantes de contaminación ambiental biológica.
- ◇ 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 realización de 48 determinaciones. La relación de reactivos incluidos en el kit es la siguiente:

- **General Master Mix III:** Master Mix general de PCR con las cantidades de enzima, nucleótidos y tampón necesarios para llevar a cabo las reacciones de amplificación.
- **Buffer TP53:** contiene $MgCl_2$ a la concentración necesaria para llevar a cabo las reacciones de amplificación.
- Agua libre de nucleasas para las reacciones de PCR.
- **Pool A PCR y Pool B PCR:** contienen los oligonucleótidos necesarios para llevar a cabo la amplificación de las regiones diana del kit.
- **TP53 Index:** oligonucleótidos usados en la 2ª reacción de PCR con una secuencia única de 8 nucleótidos, compatible con los adaptadores de Illumina. Los *Index* son necesarios para marcar las librerías de cada muestra con una combinación única que permitirá su análisis y discriminación tras la secuenciación. El kit incluye los *index* necesarios para la secuenciación simultánea de 48 muestras.

Reactivos	Color	Cantidad	Conservación
General Master Mix III	Disco Blanco	2 x 336 µL	-20°C
Buffer TP53	Disco Negro	1 x 375 µL	-20°C
Agua	Disco Verde	2 x 833 µL	-20°C
Pool A PCR	Disco Morado	1 x 144 µL	-20°C
Pool B PCR	Disco Amarillo	1 x 144 µL	-20°C
TP53 Index	Placa Morada	48 x 6 µL	-20°C

Table 1. Reactivos de TP53 OncoKitDx

06

Equipos, reactivos y materiales que no se suministran

Equipos:

- Termociclador
- Micropipetas de 10 µL, 20 µL, 200 µL y 1000 µL
- *Vortex*
- Centrifuga
- Soporte imantado
- Bloque agitador
- Fluorímetro (Recomendado: *Qubit*; Thermo Fisher Scientific)
- Secuenciador NGS (Illumina)
- *TapeStation System* de Agilent Technologies (opcional)

Reactivos:

- *Agencourt® AMPure® XP beads* (cat. no. A63880, A63881 o A63882; Beckman Coulter Genomics)
- *Etanol absolute*
- *Elution Buffer* (cat.no. 19086; Qiagen)
- Agua libre de nucleasas
- Recomendado: *Qubit dsDNA HS Assay kit* (cat. no. Q32854; Invitrogen)
- *NaOH 0.2N* (cat.no. 1091401000; Fluka)
- *PhiX Control v3* (cat. no. FC-110-3001; Illumina)
- *TapeStation* (Opcional): *High Sensitivity D1000 Reagents* (cat. no. 5067-5585; Agilent)

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)
- Tubos estériles de 0.2 mL y 1.5 mL
- Guantes de látex
- *Qubit* (recomendado): *Qubit™ assay tubes* (Ref: Q32856; Invitrogen)
- *TapeStation* (Opcional): *High Sensitivity D1000 ScreenTape* (cat. no. 5067-5584; Agilent)

NOTA

TP53 OncoKitDx está preparado para usarse en combinación con los kits *imagen® Sample tracking A y B* (REF: IMG-234 y IMG-311), 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

07.1 | Preparación de la primera reacción de amplificación

TP53 OncoKitDx incluye dos *pools* de cebadores (*PCR-Pool A* y *PCR-Pool B*), necesarios para amplificar las regiones genómicas de interés mediante *PCR multiplex*. Por tanto, para cada muestra se llevarán a cabo dos reacciones, una para el *Pool A*, y otra para el *Pool B*. A continuación, se detallan los pasos a seguir para llevar a cabo este ensayo.

- 01 Descongelar el *Master-Mix General III*, el *Buffer TP53*, *PCR-Pool A*, *PCR-Pool B*, agua y el ADN de las muestras. Dar un *vórtex* a cada uno de los reactivos y mantener en frío.
- 02 Preparar en tubos de 1.5mL, las cantidades de reactivos según se indican a continuación. Se recomienda realizar los cálculos añadiendo reactivos suficientes para analizar una reacción más, o bien añadir un 10% más de cada uno de los reactivos.

Reactivos	Volumen Pool A	Volumen Pool B
General Master Mix III	4 µL	4 µL
TP53 Buffer	1.2 µL	1.2 µL
Agua	9.8 µL	9.8 µL
Pool A PCR	3 µL	-
Pool B PCR	-	3 µL

- 03 Agitar en *vortex* los mix de PCR y distribuir 18µL en los pocillos de PCR correspondientes.

Opcional: Seleccionar uno de los reactivos de seguimiento de la muestra (*Sample tracking A* y *B*; Ref. IMG-234 y IMG-311) y añadirlo a la muestra aplicándole una dilución 1/5. Ejemplo: 1 µl de plásmido + 4 µl de la muestra a la concentración indicada en el paso siguiente. Los kits de trazabilidad de las muestras permiten analizar simultáneamente hasta 24 muestras.

- 04 Añadir 2µl de ADN de la muestra (10 ng/µL, cuantificada con el fluorímetro *Qubit*, Thermo Fisher Scientific), o de agua libre de nucleasas (control negativo) a los pocillos correspondientes. En caso de que la muestra extraída tenga una concentración menor de la indicada, ajustar el volumen de muestra con la correspondiente cantidad de agua para que cada reacción contenga 20ng totales de ADN.
- 05 Colocar los tubos en el termociclador y ejecutar el siguiente programa de amplificación. Ratio de las rampas (4°C/s):

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	15 minutos	1
95°C	30 segundos	
60°C	1 minuto	22
72°C	30 segundos	
72°C	5 minutos	1
10°C	∞	1

Table 2. Programa de PCR óptimo para SimpliAmp Thermal Cycler y GeneAmp PCR System 9700

↘ Es posible detener el protocolo en este punto. Los productos de PCR pueden almacenarse a 4°C si se va a continuar con el protocolo en las próximas 24 horas o a -20°C para periodos de tiempo superiores.

07.2 | Preparación de la segunda reacción de amplificación

En la segunda reacción de amplificación tiene lugar la adición de los *index* y adaptadores para llevar a cabo la PCR en puente con las plataformas de secuenciación masiva de Illumina.

NOTA: En esta segunda PCR se llevará a cabo una reacción por cada muestra.

- 01 Descongelar el *Master-Mix General III*, el Tampón TP53, la placa de *index*, y los productos de la primera PCR en caso de haber sido congelados. Dar un *vórtex* a cada uno de los reactivos y mantener en frío. Para cada muestra corrida en un mismo run será necesaria una pareja de *Index* diferente. Tanto la localización de los *index* (ya emparejados a la concentración apropiada), como la secuencia de cada uno de ellos, se especifica en las tablas 1 y 2 del Anexo I de este manual.
- 02 Preparar en tubos de 1.5mL, las cantidades de reactivos según se indican a continuación. En esta segunda PCR se llevará a cabo una reacción por muestra a secuenciar. Se recomienda realizar los cálculos añadiendo reactivos suficientes para analizar una reacción más, o bien añadir un 10% más de cada uno de los reactivos.

Reactivos	Volumen por reacción
General Master Mix III	6 µL
Buffer TP53	5.4 µL
Agua	15.1 µL

- 03 Agitar en *vortex* los *mix* de PCR y distribuir 26.5 µL en los pocillos de PCR correspondientes.
- 04 Añadir 1.5 µL de la pareja de *index* seleccionada para cada muestra.
- 05 Añadir 1 µL del producto de PCR del *Pool A* de la muestra, y 1 µL del producto de PCR del *Pool B* de la muestra.

NOTA: Al tratarse de una PCR en la que como ADN molde se utilizan productos ya amplificados, para evitar posibles contaminaciones, recomendamos preparar el *mix* de PCR en un laboratorio pre-PCR y realizar el paso 5 del protocolo en una zona post-PCR. Además, se recomienda limpiar las superficies de laboratorio con productos de descontaminación de ADN.

- 06 Llevar a cabo las reacciones de amplificación ejecutando el siguiente programa de PCR. Ratio de las rampas (4°C/s):

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	15 minutos	1
95°C	30 segundos	
60°C	90 segundos	25
72°C	30 segundos	
72°C	5 minutos	1
10°C	∞	1

Table 3. Programa de PCR óptimo para SimpliAmp Thermal Cycler y GeneAmp PCR System 9700

↙ Es posible detener el protocolo en este punto. Los productos de PCR pueden almacenarse a 4°C si se va a continuar con el protocolo en las próximas 24 horas o a -20°C para periodos de tiempo superiores.

07.3 | Purificación de los productos PCR

Para este proceso es necesario atemperar los reactivos *AMPure XP Beads* (REF: A63881; Beckman Coulter Inc) y *Elution Buffer* (REF: 19086; Qiagen) 30 minutos antes de utilizarlos y 400µL de etanol al 80% por reacción.

- 01 Agitar vigorosamente las partículas magnéticas.
- 02 Preparar un tubo *ependorf* de 1,5 mL por muestra.
- 03 Añadir 25 µL de AMPure XP Beads a cada tubo *ependorf* de 1,5 mL (Ratio 1:1).
- 04 Transferir 25 µL de cada reacción de PCR a su tubo correspondiente de 1.5 mL.
- 05 Agitar los tubos en bloque, durante 2 minutos, a 1800 rpms y a temperatura ambiente.
- 06 Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 07 Colocar los tubos en un soporte imantado durante 2 minutos para que las partículas magnéticas se adhieran bien al imán.
- 08 Retirar el sobrenadante pipeteando con cuidado.
- 09 Añadir 200 µL de EtOH al 80%, preparado en el momento.
- 10 Repetir los pasos 8 y 9 del protocolo.
- 11 Retirar el sobrenadante. Es muy importante que no queden restos de etanol.
- 12 Dejar secar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Durante este tiempo eliminar cualquier resto que haya podido quedar en las paredes del tubo.
- 13 Añadir 25 µL del reactivo *Elution Buffer*.
- 14 Retirar los tubos del soporte imantado y resuspender vigorosamente con *vortex* hasta que la solución *bolas-elution buffer* quede bien homogénea.
- 15 Incubar 2-10 minutos a temperatura ambiente.
- 16 Colocar de nuevo los tubos en el soporte imantado durante 2 minutos para que las bolas magnéticas se adhieran bien al imán.
- 17 Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y descartar el tubo con las partículas magnéticas

↙ Es posible detener el protocolo en este punto. Los productos de PCR pueden almacenarse a 4°C si se va a continuar con el protocolo en las próximas 24 horas o a -20°C para periodos de tiempo superiores.

07.4 | Preparación de las librerías para la secuenciación

➔ CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE LAS LIBRERÍAS

En primer lugar, Health in Code S.L recomienda comprobar el tamaño de las librerías obtenidas empleando *Tape Station 2200* y los kits comerciales *High Sensitivity D1000 Reagents* (Ref: 5067-5585) y *High Sensitivity D1000 ScreenTape* (Ref: 5067-5584) de Agilent Technologies; o usando un gel de agarosa al 3%. Tras el análisis de las muestras se debe obtener un tamaño medio de la librería de 280-300 pb, como se muestra en la siguiente imagen. En caso de obtener otro tamaño revise el protocolo o póngase en contacto con el servicio técnico de Health in Code S.L.

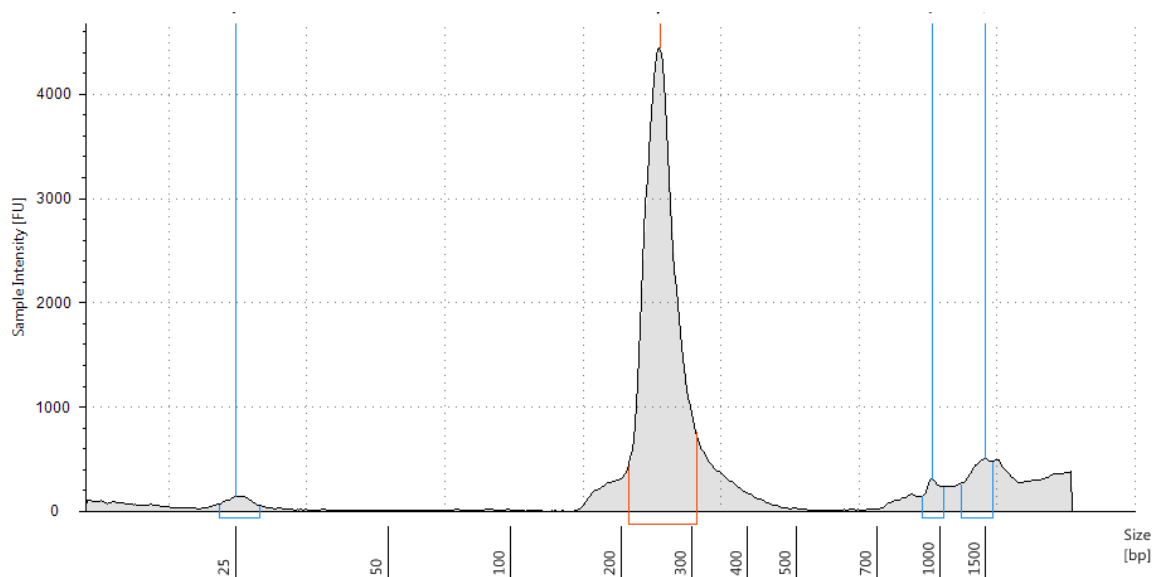


Figure 1. Resultado esperado tras el análisis del tamaño de librerías con la TapeStation 2200

A continuación, para medir la concentración del ADN, se recomienda el uso del fluorímetro *Qubit® 2.0*, el kit comercial *Qubit ds DNA HS Assay kit* (Ref: Q32854) y los tubos *Qubit™ assay tubes* (Ref: Q32856) de Invitrogen.

Con el dato de concentración obtenido por *Qubit* y siguiendo la siguiente fórmula, se obtendrá la concentración de las librerías:

$$\text{Concentración librerías (nM)} = (\text{Concentración (ng/}\mu\text{L)}) \times 5.36$$

NOTA: El valor 5.36 resulta del tamaño medio del amplicón y la conversión de unidades.

➤ GENERACIÓN DE LA SAMPLE SHEET

La *Sample Sheet*, necesaria para la secuenciación, se puede generar empleando el programa Illumina Experiment Manager, siguiendo los siguientes pasos.

- 01 Abrir el programa y seleccionar la opción: *Create Sample Sheet*.
- 02 Seleccionar la opción *Miseq>Next*.
- 03 Seleccionar *Other>FASTQ Only>Next*.
- 04 Rellenar para cada ensayo los campos: *Reagent Cartridge Barcode*, *Library Prep Workflow (Nextera XT)*, *Index Adapters (Kit D)*, *Index Reads (2, dual)*, *Experiment Name*, *Investigator Name and Description*. El resto de los campos quedarán como en la imagen que se muestra a continuación:

Figure 2. Generación de la *Sample Sheet* con Illumina Experiment Manager

- 05 Seleccionar *Next*
- 06 En la siguiente pantalla, añadir (seleccionando *Add Blank Row*) una fila por cada muestra incluida en el ensayo.
- 07 Rellenar los campos de cada muestra.
- 08 Seleccionar *Finish*.
- 09 Aparecerá la opción de guardar la *Sample Sheet* creada. Guardar como .csv.

➤ DESNATURALIZACIÓN Y CARGA DE LAS LIBRERÍAS

A continuación, se debe llevar a cabo el protocolo de desnaturalización previa a la carga en Illumina *MiSeq*:

- 01 Descongelar el reactivo HT1 (incluido en el kit de reactivos de Illumina con el que se vaya a llevar a cabo la secuenciación; por ejemplo: *MiSeq Reagents nano Kit v2* (300 ciclos. Ref: MS-103-1001) 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 12.5 pM (seguir el protocolo de desnaturalización de *PhiX control v3*, proporcionado junto con el reactivo, por Illumina).
- 03 Diluir cada librería a una concentración de 2 nM con el reactivo *Elution Buffer*.
- 04 Unir todas las librerías que se vayan a cargar en un mismo run en un único *pool*. Para ello, se añaden 10 µL de cada una de ellas a un tubo nuevo de 1.5 mL. Dar *vortex* y *spin*.
- 05 Añadir 5 µL del *pool* de librerías a un tubo de 1.5 mL y 5 µL de *NaOH 0.2N* (No suministrado con el kit). Agitar en *vortex* y *spin*.
- 06 Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 07 Añadir 990 µl de HT1 y agitar empleando *vortex*.
- 08 A este mix, añadir 60 µL de *PhiX control* desnaturalizado y diluido a 12.5 pM. En este momento las librerías estarán a 9.4 pM.
- 09 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 dependiendo del kit de secuenciación usado, para garantizar un número mínimo de *clusters* de, aproximadamente 20.000 por muestra, y una profundidad mínima de 500x:

MiSeq Reagents Kit	N.º máximo de muestras
MiSeq Reagents nano Kit v2 (300 ciclos). Ref: MS-103-1001	48
MiSeq Reagents micro Kit v2 (300 ciclos). Ref: MS-103-1002	160

Table 4. Kit de MiSeq Illumina y número máximo de muestras a analizar con TP53 OncoKitDx

NOTA: El kit incluye *index* para analizar 48 muestras, en caso de necesitar analizar más muestras en un mismo ensayo de secuenciación, contacte con el servicio técnico de Health in Code S.L.

En caso de poseer otros kits de mayor capacidad se pueden cargar las librerías de **TP53 OncoKitDx** junto con otras siempre y cuando estén marcadas con *index* de 8 nucleótidos.

En caso de utilizar otros equipos de secuenciación masiva de Illumina, la concentración final de las librerías dependerá de lo que especifiquen los protocolos de estas plataformas.

Una vez creada la *Sample Sheet* y desnaturalizadas las librerías, se seguirán los pasos indicados por el secuenciador para iniciar el proceso de secuenciación (*MiSeq Control Software*).

08 Análisis de los resultados

El análisis bioinformático de los resultados se realiza mediante un pipeline de análisis diseñada especialmente para **TP53 OncoKitDx** a través de la plataforma **Data Genomics**. El acceso a esta herramienta se realiza a través de 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.

08.1 | Solicitud de análisis

- 01** Seleccionar "*Import Sample Sheet*" en la pantalla principal (pestaña de Solicitudes) para iniciar el análisis de las muestras secuenciadas. De esta forma se accede a la pantalla de importación de ficheros. En dicha pantalla se deben importar los ficheros *fastq* asociados a las muestras y, opcionalmente, el fichero de la *SampleSheet*, que permitiría importar todos los ficheros del mismo run de secuenciación simultáneamente.
- 02** Una vez cargados los ficheros, se deberá indicar el nombre del run de secuenciación, seleccionar la modalidad de estudio, **TP53 OncoKitDx**, y el STID (*Sample Tracking ID*) usado en cada muestra (o "no contiene" en caso de no haber usado ninguno)
- 03** Para llevar a cabo la solicitud, seleccionar "Procesar". Cuando haya finalizado el proceso con éxito aparecerá un mensaje "**✓ la importación se ha realizado correctamente**".

The screenshot shows the 'Import samples' page. At the top left is the 'data genomics' logo. At the top right are links for 'Site survey' and 'User guide'. The main heading is 'Import samples'. Below this, there are two main sections: 'Data files' (with sub-sections 'Files' and 'Folders') and 'Add Sample Sheet'. A 'Load' button is positioned below these sections. Below the 'Load' button is a table with the following columns: 'Sample Name' (with an upward arrow), 'Comments', 'STID', and 'Tumoral Sample Files'. The table body is currently empty. At the bottom of the page, there are three buttons: 'Process' (with a play icon), 'Cancel all samples' (with a stop icon), and 'Back to orders' (with a left arrow icon).

Figure 3. Pantalla para importar los ficheros fastq, la sample sheet e iniciar la solicitud de análisis

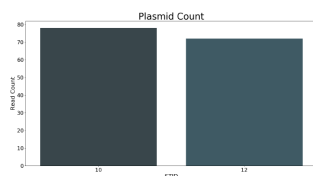
08.2 | Gestión de solicitudes

Todas las solicitudes creadas aparecerán en la pantalla "Orders" dentro del correspondiente apartado según el estado en el que se encuentran (en espera, pendiente, en proceso, finalizado, cancelado o en revisión). 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.

En caso de que la secuenciación no haya pasado los controles de calidad establecidos o de que el reactivo de trazabilidad no coincida con el esperado, aparecerá una alerta sobre el botón correspondiente al control de calidad ("Request: Bioinformatics"), una vez haya finalizado el análisis bioinformático. seleccionando este icono se accederá directamente al informe del control de calidad.

El acceso a todos los ficheros descargables producto del análisis bioinformático puede llevarse a cabo seleccionando el botón "Show results". En esta pantalla aparecen a disposición del usuario. En los ficheros de alineamiento (bam y bai), el listado de variantes (vcf), además de otros ficheros con información sobre coberturas y el informe de calidad de la secuenciación tras el análisis bioinformático, donde se incluye la comprobación de que el reactivo de trazabilidad obtenido coincide con el esperado, como se muestra en la figura siguiente:



Counts of each plasmid detected.

QC of the tracking sample

Feature	Obtained	Expected	Status
STID	1012	1210	MATCH

Figure 4. Control de calidad del sistema integrado de trazabilidad

08.3 | Filtrado de variantes

Seleccionando el botón de "Filtering", se accederá a una pantalla emergente con todas las variantes encontradas en TP53, y todos los datos relacionados a dichas variantes.

Gene	Chr	Ref	Alt	Pos	CleanTotal	Zygosity	VariantFreq	Prot. Effect	chrPos	pLig-s	dbSnpId	Disease CV	Clinical Sign	Own Frac Freq	Own Freq	Max All Freq	Category	Image Cate	Actions	
TP53	17	A	G	7572419	702	HOHG_REF	0.00850	3_prime_UTR_variant	c.1121C				n/a	n/a	0.00000	+	-	KOV	📄	
TP53	17	A	G	7572419	702	HOHG_REF	0.00850	3_prime_UTR_variant	c.1121C				n/a	n/a	0.00000	+	-	KOV	📄	
TP53	17	A	G	7572419	702	HOHG_REF	0.00850	3_prime_UTR_variant	c.1213T				n/a	n/a	0.00000	+	-	KOV	📄	
TP53	17	A	G	7572419	702	HOHG_REF	0.00850	3_prime_UTR_variant	c.1501T				n/a	n/a	0.00000	+	-	KOV	📄	
TP53	17	A	G	7572419	702	HOHG_REF	0.00850	3_prime_UTR_variant	c.1121T				n/a	n/a	0.00000	+	-	KOV	📄	
TP53	17	A	G	7572419	702	HOHG_REF	0.00850	3_prime_UTR_variant	c.1501T				n/a	n/a	0.00000	+	-	KOV	📄	
TP53	17	A	G	7572419	702	HOHG_REF	0.00850	3_prime_UTR_variant	c.1213T				n/a	n/a	0.00000	+	-	KOV	📄	
TP53	17	A	G	7572419	702	HOHG_REF	0.00850	3_prime_UTR_variant	c.1501T				n/a	n/a	0.00000	+	-	KOV	📄	
TP53	17	A	G	7572419	702	HOHG_REF	0.00850	3_prime_UTR_variant	c.1121T				n/a	n/a	0.00000	+	-	KOV	📄	
TP53	17	A	G	7572419	702	HOHG_REF	0.00850	3_prime_UTR_variant	c.1501T				n/a	n/a	0.00000	+	-	KOV	📄	
TP53	17	A	G	7572419	702	HOHG_REF	0.00850	3_prime_UTR_variant	c.1213T				n/a	n/a	0.00000	+	-	KOV	📄	
TP53	17	A	G	7572419	702	HOHG_REF	0.00850	3_prime_UTR_variant	c.1501T				n/a	n/a	0.00000	+	-	KOV	📄	
TP53	17	A	G	7572419	702	HOHG_REF	0.00850	3_prime_UTR_variant	c.1121T				n/a	n/a	0.00000	+	-	KOV	📄	
TP53	17	A	G	7572419	702	HOHG_REF	0.00850	3_prime_UTR_variant	c.1501T				n/a	n/a	0.00000	+	-	KOV	📄	
TP53	17	A	G	7572419	702	HOHG_REF	0.00850	3_prime_UTR_variant	c.1213T				n/a	n/a	0.00000	+	-	KOV	📄	
TP53	17	A	G	7572419	702	HOHG_REF	0.00850	non_coding_transcript_antisense	c.1391T				n/a	n/a	0.00000	+	-	KOV	📄	
TP53	17	A	G	7572419	702	HOHG_REF	0.00850	non_coding_transcript_antisense	c.1468T				n/a	n/a	0.00000	+	-	KOV	📄	
TP53	17	A	T	7572421	1440	HOHG_REF	0.00550	3_prime_UTR_variant	c.767A		rs38957704	not_specified,n	CONFLICTING_INTERP	n/a	n/a	0.00008	+	-	KOV	📄
TP53	17	A	T	7572421	1440	HOHG_REF	0.00550	3_prime_UTR_variant	c.767A		rs38957704	not_specified,n	CONFLICTING_INTERP	n/a	n/a	0.00008	+	-	KOV	📄
TP53	17	A	T	7572421	1440	HOHG_REF	0.00550	3_prime_UTR_variant	c.1007A		rs38957704	not_specified,n	CONFLICTING_INTERP	n/a	n/a	0.00008	+	-	KOV	📄

Figure 5. Variants Filtering in Data Genomics

- + En la pestaña "Filters" se pueden aplicar diferentes modificaciones del filtrado de variantes según se desee. Estos filtros quedarán guardados en el análisis.
- + En la columna "Category", cada variante puede ser categorizada en cinco niveles de patogenicidad por el propio usuario. El histórico de estas clasificaciones queda almacenado para el análisis de futuras muestras.
- + En la columna "Actions", seleccionando la opción IGV, se puede visualizar la secuencia de cada variante.
- + Durante el análisis bioinformático, se lleva a cabo el cálculo de la frecuencia alélica de cada variante encontrada dentro de la población de muestras analizadas por el usuario con esta herramienta. Dichos cálculos aparecerán en la pantalla de análisis de variantes en dos columnas:
 - ◇ Frq Own: Frecuencia alélica de la variante en las muestras del cliente en las que se ha buscado.
 - ◇ Frac Freq Own: Fracción entre el número de veces que aparece la variante y el número de muestras totales del cliente en las que se ha analizado esta región.
- + Es posible generar un archivo de las variantes seleccionadas para cada muestra, ya sea como csv o como informe en pdf. Estos informes permanecerán almacenados junto con el resto de la información asociada a cada muestra.

En caso de requerir información adicional sobre el manejo de la herramienta de análisis bioinformático, puede acceder al manual de **Data Genomics** a través del enlace www.datagenomics.es

09 Troubleshooting

A continuación, se enumeran los posibles resultados no esperados a lo largo del protocolo de amplificación y secuenciación de las dianas del **TP53 OncoKitDx**.

+ Concentración excesivamente baja de las librerías:

Concentraciones inferiores a 10 ng/μl pueden deberse a un fallo en el protocolo de amplificación, o en la purificación de las librerías. En este caso se recomienda analizar la librería con *TapeStation 2200*, utilizando los kits comerciales *High Sensitivity D1000 Reagents* (Ref: 5067-5585) y *High Sensitivity D1000 ScreenTape* (Ref: 5067-5584) de Agilent Technologies (Figura 1).

- ◇ Si el tamaño medio de la librería es el esperado y está entre 280-300 pb, se puede continuar con la secuenciación.
- ◇ Si en lugar de un único pico, aparecen varios picos, revise los diferentes pasos del protocolo de amplificación y purificación.

+ Densidad de *clúster* diferente a la esperada:

En este caso se recomienda revisar la cuantificación de las librerías y el protocolo de generación del pool de librerías previo a la secuenciación.

+ La muestra no ha pasado los controles de calidad establecidos (si usted está usando el software bioinformático ofrecido por Health in Code S.L.):

En estos casos se recomienda analizar las librerías con *Tape Station 2200* (Figura 1).

- ◇ Si el tamaño medio de la librería es el esperado y está entre 280-300 pb, se aconseja revisar el protocolo de desnaturalización y carga en el secuenciador.
- ◇ Si en lugar de un único pico, aparecen varios picos, revise los diferentes pasos del protocolo de amplificación y purificación.

+ Errores en los STIDs:

En caso de usar los reactivos de trazabilidad de las muestras proporcionados por Health in Code S.L. es posible que el STID no coincida con el esperado. En este caso revise que los STIDs especificados en la *Sample Sheet* son los correctos.

10 Limitaciones

10.1 | Equipos

TP53 **OncoKitDx** ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR:

- + SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific)
- + GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific)

Si usa 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.

TP53 **OncoKitDx** ha sido validado usando la siguiente plataforma de secuenciación masiva:

- + *MiSeq 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 *MiSeq System*, la concentración final de las librerías tendrá que ajustarse a las especificaciones de los protocolos de dichas plataformas.

10.2 | Reactivos

TP53 **OncoKitDx** se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y los recomendados en el apartado 6 de este documento (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 nuestro servicio técnico.

10.3 | Plataforma de análisis bioinformático

TP53 **OncoKitDx** ha sido validado empleando **Data Genomics**, plataforma de análisis bioinformático para diagnóstico *in vitro*. Dicha plataforma incluye un pipeline de

análisis diseñada especialmente para TP53 OncoKitDx, 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.

10.4 | 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.

apéndice
/ 01

	1	2	3	4	5	6
A	S513 N716	S517 N716	S518 N716	S520 N716	S521 N716	S522 N716
B	S513 N718	S517 N718	S518 N718	S520 N718	S521 N718	S522 N718
C	S513 N719	S517 N719	S518 N719	S520 N719	S521 N719	S522 N719
D	S513 N720	S517 N720	S518 N720	S520 N720	S521 N720	S522 N720
E	S513 N721	S517 N721	S518 N721	S520 N721	S521 N721	S522 N721
F	S513 N722	S517 N722	S518 N722	S520 N722	S521 N722	S522 N722
G	S513 N723	S517 N723	S518 N723	S520 N723	S521 N723	S522 N723
H	S513 N724	S517 N724	S518 N724	S520 N724	S521 N724	S522 N724

Tabla A1. Localización de las parejas de index en la Placa-Index

Nombre	Secuencia
S513	TCGACTAG
S517	GCGTAAGA
S518	CTATTAAG
S520	AAGGCTAT
S521	GAGCCTTA
S522	TTATGCGA
N716	ACTCGCTA
N718	GGAGCTAC
N719	GCGTAGTA
N720	CGGAGCCT
N721	TACGCTGC
N722	ATGCGCAG
N723	TAGCGCTC
N724	ACTGAGCG

Tabla A2. Secuencias de cada Index del kit

Contacte con nuestro Departamento Técnico 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

