

TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN)

Instrucciones de uso (UE)

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO. SOLO PARA EXPORTACIÓN.

Uso previsto

TruSight™ Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN) es una prueba de diagnóstico cualitativa *in vitro* que utiliza secuenciación de nueva generación de las regiones de interés para permitir la evaluación de la deficiencia de recombinación homóloga (HRD, Homologous Recombination Deficiency) utilizando ADN extraído de muestras de tejido tumoral fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE) de pacientes con cáncer de ovario utilizando el instrumento Illumina® NextSeq™ 550Dx. La prueba se puede utilizar para detectar variantes de un solo nucleótido, inserciones, deleciones y grandes reordenaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, así como para notificar una puntuación de inestabilidad genómica (GIS).

La prueba está concebida para utilizarse como prueba diagnóstica acompañante para identificar pacientes con cáncer que puedan beneficiarse del tratamiento selectivo citado en la [Tabla 1](#), según el etiquetado del producto terapéutico aprobado.

Tabla 1 Indicación de prueba diagnóstica acompañante

Tipo de tumor	Biomarcador(es) detectados	Tratamiento
Cáncer ovárico, incluido el cáncer epitelial de ovario, de las trompas de Falopio y peritoneal primario	Deficiencia de recombinación homóloga (HRD) (definida como mutaciones perjudiciales o presuntamente perjudiciales en los genes BRCA1 y BRCA2 y/o puntuación de inestabilidad genómica positiva)	LYNPARZA® (olaparib)

Resumen y explicación del ensayo

Descripción clínica

El cáncer de ovario tiene la tasa de mortalidad más alta entre las neoplasias malignas ginecológicas.¹ El cáncer de ovarios incluye cánceres epiteliales de ovario, de trompas de Falopio y peritoneales primarios, todos los cuales comparten un origen biológico común y se consideran juntos con fines terapéuticos.^{2,3}

Aproximadamente la mitad de las pacientes con cáncer de ovario seroso de grado alto y endometriode, que son subcategorías histológicas aplicables a tener en cuenta, presentan defectos genómicos en la vía de reparación de recombinación homóloga que dan lugar a HRD.⁴ La presencia de HRD se asocia a la sensibilidad a la quimioterapia con un derivado del platino⁵ y a la respuesta clínica a los inhibidores de la poli (adenosina difosfato [ADP]-ribosa) polimerasa (PARP), una clase de tratamientos dirigidos para el cáncer de ovario,⁶⁻¹² lo que da lugar a una mejora de la supervivencia sin progresión y global.^{5,13,14} De acuerdo con los hallazgos de

estudios clínicos seminales,^{6,7,12,15} la idoneidad para el tratamiento con PARPi en el cáncer de ovario puede basarse en el estado positivo para HRD.¹⁶ PAOLA-1 fue un estudio multicéntrico, de fase III, aleatorizado, con doble enmascaramiento y controlado con placebo que investigó la eficacia clínica de olaparib más bevacizumab como tratamiento de mantenimiento de primera línea para los pacientes con cáncer de ovario avanzado.¹² El ensayo TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive) HRD (DRAGEN) se validó utilizando muestras de pacientes inscritos en el ensayo clínico PAOLA-1.

Entre los diversos mecanismos subyacentes que afectan a la vía de reparación de la recombinación homóloga, los mejor caracterizados son las mutaciones con pérdida de función en línea germinal y/o somática en los genes BRCA1 y BRCA2.^{4,13,17} Las pruebas que evalúan la inestabilidad genómica (p. ej., reemplazos, deleciones, alteraciones del número de copias y reordenaciones estructurales) evalúan la presencia de una cicatriz genómica o firma mutacional indicativa de la presencia de HRD independientemente de la causa subyacente. La GIS es una medición de la inestabilidad genómica que combina información sobre transiciones de estado a gran escala (LST), pérdida de heterocigosidad (LOH) y desequilibrio telomérico-alélico (TAI). Los datos de ensayos clínicos disponibles respaldan la validez clínica de la GIS como biomarcador que identifica a las pacientes con cáncer de ovario de tipo natural con BRCA, que se benefician de forma significativa del tratamiento con PARPi.^{7,9,12,18}

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) es una prueba diagnóstica complementaria (CDx) cualitativa basada en secuenciación de nueva generación (NGS) que notifica el estado de HRD en pacientes con cáncer de ovario mediante la detección de variantes pequeñas de ADN y deleciones a nivel de exones (denominadas reordenaciones grandes [LR]) en los genes BRCA1 y BRCA2, en combinación con la evaluación de la GIS en relación con un corte de 42.

Para ver la lista de regiones en los genes BRCA1 y BRCA2 que se excluyen de la llamada de variantes, consulte la *Lista de bloqueo de TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN) (n.º de documento 200066147)* disponible en el [sitio de asistencia](#) de Illumina.

Principios del procedimiento

El ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) es una prueba distribuida que se realiza de forma manual usando ácido nucleico extraído como material de entrada. El ADN extraído del tejido FFPE se usa para preparar genotecas que se enriquecen después para los genes relacionados con HRD y que se secuencian en el Instrumento NextSeq 550Dx.

El ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) implica los siguientes procesos.

- **Preparación y enriquecimiento de genotecas:** a partir de tejido FFPE, se fragmentan 40 ng de ADN genómico (ADNg) en fragmentos pequeños. Unos adaptadores universales de secuenciación se ligan a los fragmentos de ADNg. Las secuencias del adaptador P5 y P7 se incorporan a cada genoteca para permitir la unión de fragmentos de genotecas en la superficie de la celda de flujo durante la secuenciación. Los adaptadores incluyen secuencias de índices i5 e i7 para identificar cada muestra individual y moléculas individuales con el uso de identificadores moleculares únicos (UMI). A continuación, las genotecas se enriquecen para los genes concretos de interés por medio de un método basado en captura. Las secuencias de sondas biotiladas que abarcan las regiones génicas de interés del ensayo se hibridan a las

genotecas. Las sondas hibridadas a las regiones de interés de la genoteca se aíslan de las regiones de no interés por captura con bolas magnéticas de estreptavidina. Las genotecas enriquecidas de regiones de interés se lavan y se amplifican. A continuación, se normaliza la cantidad de cada genoteca enriquecida por medio de un método basado en bolas para garantizar una representación equivalente en las genotecas agrupadas para la secuenciación.

- **Secuenciación y análisis primario:** las genotecas enriquecidas normalizadas se agrupan en una celda de flujo y, a continuación, se secuencian mediante la química de secuenciación por síntesis (SBS) del NextSeq 550Dx. El proceso químico de SBS utiliza un método basado en terminadores reversibles para detectar bases de desoxinucleótido trifosfato (dNTP) único marcadas con fluorescencia a medida que se incorporan a las cadenas de ADN en crecimiento. Durante cada ciclo de secuenciación, se añade un dNTP único a la cadena de ácido nucleico. La etiqueta dNTP sirve como terminador para la polimerización. Tras cada incorporación de dNTP, el fluoróforo se fotografía y digitaliza para identificar la base y, a continuación, se desbloquea para permitir la incorporación del nucleótido siguiente. Cuatro dNTP (A, G, T y C) unidos a terminadores reversibles están presentes como moléculas únicas e independientes. Como resultado, la competencia natural minimiza la tendencia a la incorporación. Durante el análisis principal, las llamadas de bases se realizan directamente a partir de las medidas de intensidad de la señal durante cada ciclo de secuenciación, lo que da como resultado una secuenciación base a base. Se asigna una puntuación de calidad a cada llamada de bases.
- **Análisis secundario:** el TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) analysis module está integrado en el DRAGEN Server como parte del Instrumento NextSeq 550Dx para facilitar la configuración de experimentos con TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) y poder realizar el análisis secundario de los resultados de secuenciación. El TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) analysis module realiza el análisis que incluye la validación del procesamiento y el control de calidad de los experimentos, seguida del demultiplexado, la generación de archivos FASTQ, la alineación y la llamada de variantes. El demultiplexado separa datos de las genotecas agrupadas en función de los índices de secuencia únicos que se añadieron durante el procedimiento de preparación de genotecas. El software genera archivos intermedios FASTQ, que contienen las lecturas de secuenciación con puntuaciones de calidad para cada muestra, excepto las lecturas de los grupos que no hayan superado el filtro. A continuación, las lecturas de secuenciación se alinean con un genoma de referencia para identificar una relación entre las secuencias y se les asigna una puntuación según las regiones de similitud. Las lecturas alineadas se escriben en archivos con formato BAM. El software del ensayo utiliza algoritmos independientes para llamar a las variantes pequeñas de ADN de BRCA1 y BRCA2, reordenaciones grandes de BRCA1 y BRCA2 y GIS. El módulo del software de análisis genera múltiples resultados, que incluyen criterios de medición de secuenciación y archivos en formato VCF. Los archivos VCF contienen información sobre las variantes que se encuentran en posiciones específicas de un genoma de referencia. Los criterios de medición de secuenciación y los archivos de salida individuales se generan para cada muestra.
- **Análisis terciario:** el análisis terciario, realizado por el TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) analysis module, consta de llamadas CDx y generación de informes de resultados. Los resultados de variantes interpretados aparecen resumidos en el informe de resultados de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Para obtener

información más detallada sobre los análisis secundarios y terciarios, consulte *Guía de flujo de trabajo de Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) Analysis Module (n.º de documento 200080937)*.

Limitaciones del procedimiento

Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

- Para un uso exclusivo bajo prescripción. La prueba debe ser solicitada por un profesional médico cualificado de acuerdo con las normativas del laboratorio clínico.
- Las decisiones sobre la atención y el tratamiento del paciente se deben basar en la opinión cualificada independiente del médico que lo trate, teniendo en cuenta toda la información aplicable sobre el estado del paciente, como los antecedentes de este y su familia, las exploraciones físicas, la información de otras pruebas diagnósticas y las preferencias del paciente, de acuerdo con la norma de atención en una comunidad determinada.
- La calidad de la muestra FFPE es muy variable. La calidad puede verse afectada de la siguiente manera.
 - Las muestras que no se sometieron a los procedimientos de fijación estándar podrían no generar ácidos nucleicos extraídos que cumplan con los requisitos de control de calidad del ensayo ([Control de calidad, en la página 72](#)).
 - Es posible que las mutaciones somáticas conductoras no se detecten de forma fiable si el contenido tumoral (por superficie) es inferior al 20 %.
 - La GIS puede no ser fiable si el contenido tumoral (por área) es inferior al 33 %.
- No se ha evaluado el rendimiento de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) en muestras obtenidas de pacientes que han recibido un trasplante de órganos o tejidos.
- La detección de contaminación puede verse afectada de la siguiente manera.
 - En genomas muy reordenados con deleciones y pérdida de heterocigosidad, el software TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) puede clasificar erróneamente una muestra de ADN como contaminada (CONTAMINATION_SCORE > 1457).
 - La contaminación durante el procedimiento puede deberse al ácido nucleico de los pasos de procesamiento de muestras anteriores. Las buenas prácticas de laboratorio y el cumplimiento de todas las precauciones y directrices de este prospecto ayudan a evitar la contaminación cruzada entre muestras.
- Un resultado negativo no permite descartar la presencia de una mutación por debajo de los límites de detección (LoD) del ensayo. Es posible que las alteraciones en las frecuencias alélicas por debajo del LoD establecido no se detecten de forma sistemática.
- La sensibilidad para la detección de variantes pequeñas de ADN se puede ver afectada por:
 - El contexto genómico de baja complejidad.
 - El aumento de la longitud de las variantes.

- TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) se ha validado para detectar inserciones y deleciones de BRCA de hasta 19 pb de longitud y reordenaciones grandes de BRCA a nivel de exones o superiores. Es posible que el ensayo no detecte variantes de más de 19 pb de longitud y que las alteraciones y los acontecimientos subexónicos afecten al estado de HRD. Se aconsejan correlaciones clinicopatológicas y de laboratorio adecuadas.
- Las deleciones a nivel de exones son las únicas reordenaciones grandes notificadas por TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). El ensayo no notifica las inserciones a nivel de exones.

Componentes del producto

La prueba TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) consta de los componentes siguientes:

- Kit TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN) (n.º de catálogo de Illumina 20140799): el kit incluye reactivos con volumen suficiente para generar 24 genotecas de ADN. Este volumen incluye muestras de pacientes y controles. El kit contiene el juego de sondas utilizado para detectar mutaciones de BRCA. Los controles se venden por separado (consulte [Reactivos necesarios no suministrados, en la página 14](#)).



PRECAUCIÓN

Los reactivos de preparación de genotecas de ARN se suministran con el kit TSO Comprehensive (DRAGEN), pero no son necesarios para el ensayo TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

- Kit TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN) (n.º de catálogo de Illumina 20134650): el kit incluye reactivos con volumen suficiente para generar 24 enriquecimientos de genotecas de ADN. Este volumen incluye muestras de pacientes y controles. El kit contiene el juego de sondas utilizado para la determinación de la GIS.
- Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) Analysis Module (n.º de catálogo de Illumina 20132935), que incluye los componentes siguientes:
 - TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Paquetes de reclamaciones
 - Paquete de software TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)
 - TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Kit USB

Un representante del servicio técnico de Illumina instala la versión adecuada del TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) analysis module en el DRAGEN Server para el Instrumento NextSeq 550Dx. Para obtener información sobre el módulo de análisis, consulte *Guía de flujo de trabajo de Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) Analysis Module* (n.º de documento 200080937).

Reactivos

Reactivos suministrados

Illumina proporciona los siguientes reactivos.

Kit TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN) (n.º de catálogo de Illumina 20140799)**TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze), n.º de referencia 20031118**

Reactivo	Número de referencia	Cantidad	Volumen	Principios activos	Temperatura de almacenamiento
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Solución acuosa tamponada con ADN polimerasa T4 y polinucleótido quinasa	Entre -25 °C y -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Solución acuosa tamponada con sales y nucleótidos	Entre -25 °C y -15 °C
Adaption Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Solución acuosa tamponada con sales	Entre -25 °C y -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Solución acuosa tamponada con ligasa	Entre -25 °C y -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)*	20031439	1	290 µl	Solución acuosa tamponada con oligonucleótidos de secuenciación universal	Entre -25 °C y -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Solución acuosa tamponada con oligonucleótidos de secuenciación universal	Entre -25 °C y -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Solución acuosa tamponada con sales	Entre -25 °C y -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Solución acuosa tamponada con ADN polimerasa y nucleótidos	Entre -25 °C y -15 °C

* Reactivo proporcionado, pero no necesario para TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate), n.º de referencia 20031119

Reactivo	Número de referencia	Cantidad	Volumen	Principios activos	Temperatura de almacenamiento
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Solución acuosa tamponada con sales	Entre 2 °C y 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Solución acuosa con bolas magnéticas	Entre 2 °C y 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Solución de Tris EDTA	Entre 2 °C y 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, n.º de referencia 20031120

Principios activos: solución acuosa tamponada con cebadores de oligonucleótido con códigos de barras individuales.

**PRECAUCIÓN**

No combine cebadores de índices CPxx y UPxx entre sí en la misma genoteca.

Cebador de índice	N.º de referencia	Cantidad	Volumen	Índice i7	Secuencia i7	Índice i5	Secuencia i5	Temperatura de almacenamiento
UP01	20031445	1	24 µl	D702	TCCGGAGA	D503	AGGATAGG	Entre -25 °C y -15 °C
UP02	20031446	1	24 µl	D707	CTGAAGCT	D504	TCAGAGCC	Entre -25 °C y -15 °C
UP03	20031447	1	24 µl	D717	CGTAGCTC	D509	CATCCGAA	Entre -25 °C y -15 °C
UP04	20031448	1	24 µl	D706	GAATTCGT	D510	TTATGAGT	Entre -25 °C y -15 °C
UP05	20031449	1	24 µl	D712	AGCGATAG	D513	ACGAATAA	Entre -25 °C y -15 °C
UP06	20031450	1	24 µl	D724	GCGATTAA	D515	GATCTGCT	Entre -25 °C y -15 °C
UP07	20031451	1	24 µl	D705	ATTCAGAA	D501	AGGCTATA	Entre -25 °C y -15 °C
UP08	20031452	1	24 µl	D713	GAATAATC	D502	GCCTCTAT	Entre -25 °C y -15 °C
UP09	20031453	1	24 µl	D715	TTAATCAG	D505	CTTCGCCT	Entre -25 °C y -15 °C
UP10	20031454	1	24 µl	D703	CGCTCATT	D506	TAAGATTA	Entre -25 °C y -15 °C
UP11	20031455	1	24 µl	D710	TCCGCGAA	D517	AGTAAGTA	Entre -25 °C y -15 °C
UP12	20031456	1	24 µl	D701	ATTACTCG	D518	GACTTCCT	Entre -25 °C y -15 °C
UP13	20031457	1	24 µl	D716	ACTGCTTA	D511	AGAGGCGC	Entre -25 °C y -15 °C
UP14	20031458	1	24 µl	D714	ATGCGGCT	D512	TAGCCGCG	Entre -25 °C y -15 °C
UP15	20031459	1	24 µl	D718	GCCTCTCT	D514	TTCGTAGG	Entre -25 °C y -15 °C
UP16	20031460	1	24 µl	D719	GCCGTAGG	D516	CGCTCCGC	Entre -25 °C y -15 °C

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, n.º de referencia 20031126

Principios activos: solución acuosa tamponada con cebadores de oligonucleótido con códigos de barras individuales.

**PRECAUCIÓN**

No combine cebadores de índices CPxx y UPxx entre sí en la misma genoteca.

Cebador de índice	Número de referencia	Cantidad	Volumen	Índice i7	Secuencia	Índice i5	Secuencia	Temperatura de almacenamiento
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	Entre -25 °C y -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	Entre -25 °C y -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	Entre -25 °C y -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	Entre -25 °C y -15 °C

Cebador de índice	Número de referencia	Cantidad	Volumen	Índice i7	Secuencia	Índice i5	Secuencia	Temperatura de almacenamiento
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	Entre -25 °C y -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	Entre -25 °C y -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	Entre -25 °C y -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	Entre -25 °C y -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	Entre -25 °C y -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	Entre -25 °C y -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	Entre -25 °C y -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	Entre -25 °C y -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	Entre -25 °C y -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	Entre -25 °C y -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	Entre -25 °C y -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	Entre -25 °C y -15 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), n.º de referencia 20031123

Reactivo	Número de referencia	Cantidad	Volumen	Principios activos	Temperatura de almacenamiento
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Solución acuosa tamponada con formamida y sales	Entre 2 °C y 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Solución acuosa tamponada con sales y bolas paramagnéticas de fase sólida revestidas de forma covalente con estreptavidina	Entre 2 °C y 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Solución de hidróxido sódico	Entre 2 °C y 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Solución acuosa tamponada	Entre 2 °C y 8 °C
Library Normalization Beads (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Solución acuosa tamponada con bolas paramagnéticas de fase sólida	Entre 2 °C y 8 °C

Reactivo	Número de referencia	Cantidad	Volumen	Principios activos	Temperatura de almacenamiento
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Solución acuosa tamponada con sales, 2-mercaptoetanol y formamida	Entre 2 °C y 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Solución acuosa tamponada con sales	Entre 2 °C y 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Solución acuosa tamponada con sales	Entre 2 °C y 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Solución acuosa con bolas magnéticas	Entre 2 °C y 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze), n.º de referencia 20031121

Reactivo	Número de referencia	Cantidad	Volumen	Principios activos	Temperatura de almacenamiento
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Solución acuosa tamponada con oligonucleótidos	Entre -25 °C y -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Solución acuosa tamponada con sales	Entre -25 °C y -15 °C
Enrichment Solution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Solución acuosa tamponada con detergente	Entre -25 °C y -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Solución acuosa tamponada con ADN polimerasa y nucleótidos	Entre -25 °C y -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Solución acuosa tamponada con cebadores P5 y P7	Entre -25 °C y -15 °C

Reactivo	Número de referencia	Cantidad	Volumen	Principios activos	Temperatura de almacenamiento
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Solución acuosa tamponada con sales, 2-mercaptoetanol y formamida	Entre -25 °C y -15 °C
PhiX (PX3 o PhiX)	20031492	1	10 µl	Solución acuosa tamponada con ADN genómico PhiX	Entre -25 °C y -15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, n.º de referencia 20031122

Reactivo	Número de referencia	Cantidad	Volumen	Principios activos	Temperatura de almacenamiento
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)*	20031494	1	290 µl	Grupo de sondas de oligonucleótidos	Entre -25 °C y -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Grupo de sondas de oligonucleótidos	Entre -25 °C y -15 °C

* Reactivo proporcionado, pero no necesario para TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, n.º de referencia 20031127

Se proporcionan los siguientes reactivos, pero no son necesarios para TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

Reactivo	Número de referencia	Cantidad	Volumen	Principios activos	Temperatura de almacenamiento
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Solución acuosa tamponada con sales y nucleótidos	Entre -25 °C y -15 °C

Reactivo	Número de referencia	Cantidad	Volumen	Principios activos	Temperatura de almacenamiento
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Solución acuosa tamponada con sales, ADN polimerasa, ribonucleasa H y nucleótidos	Entre -25 °C y -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Solución acuosa tamponada con sales y hexámeros aleatorios	Entre -25 °C y -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Solución acuosa tamponada con reverse transcriptase	Entre -25 °C y -15 °C

Kit TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN) (n.º de catálogo de Illumina 20134650)

TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate), n.º de referencia 20140116

Reactivo	Número de referencia	Cantidad	Volumen	Principios activos	Temperatura de almacenamiento
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	1	870 µl	Solución acuosa tamponada con formamida y sales	Entre 2 °C y 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	1	7,78 ml	Solución acuosa tamponada con sales y bolas paramagnéticas de fase sólida revestidas de forma covalente con estreptavidina	Entre 2 °C y 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	1	400 µl	Solución de hidróxido sódico	Entre 2 °C y 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	1	290 µl	Solución acuosa tamponada	Entre 2 °C y 8 °C

Reactivo	Número de referencia	Cantidad	Volumen	Principios activos	Temperatura de almacenamiento
Library Normalization Beads (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Solución acuosa tamponada con bolas paramagnéticas de fase sólida	Entre 2 °C y 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	1	4,8 ml	Solución acuosa tamponada con sales, 2-mercaptoetanol y formamida	Entre 2 °C y 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	1	3,5 ml	Solución acuosa tamponada con sales	Entre 2 °C y 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Solución acuosa tamponada con sales	Entre 2 °C y 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	1	6,11 ml	Solución acuosa con bolas magnéticas	Entre 2 °C y 8 °C

TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze), n.º de referencia 20140115

Reactivo	Número de referencia	Cantidad	Volumen	Principios activos	Temperatura de almacenamiento
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	1	521 µl	Solución acuosa tamponada con oligonucleótidos	Entre -25 °C y -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Solución acuosa tamponada con sales	Entre -25 °C y -15 °C
Enrichment Solution 2 (EE2)	20031488	2	1,65 ml	Solución acuosa tamponada con detergente	Entre -25 °C y -15 °C

Reactivo	Número de referencia	Cantidad	Volumen	Principios activos	Temperatura de almacenamiento
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	1	550 µl	Solución acuosa tamponada con ADN polimerasa y nucleótidos	Entre -25 °C y -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	1	150 µl	Solución acuosa tamponada con cebadores P5 y P7	Entre -25 °C y -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Solución acuosa tamponada con sales, 2-Mercaptoetanol y formamida	Entre -25 °C y -15 °C

TruSight Oncology Comp HRD Content Set, n.º de referencia 20140117

Reactivo	Número de referencia	Cantidad	Volumen	Principios activos	Temperatura de almacenamiento
Oncology DNA Probe Pool 3 (OPD3)	20082795	1	290 µl	Grupo de sondas de oligonucleótidos	Entre -25 °C y -15 °C

Reactivos necesarios no suministrados

Reactivos de preamplificación

- Reactivos de extracción y purificación de ADN: consulte [Extracción, cuantificación y almacenamiento de ácido nucleico, en la página 23](#) para conocer los requisitos de los reactivos.
- Reactivos de cuantificación de ADN: consulte [Extracción, cuantificación y almacenamiento de ácido nucleico, en la página 23](#) para conocer los requisitos de los reactivos.
- TruSight Oncology Controls:
 - TruSight Oncology DNA Control V2 (n.º de catálogo de Illumina 20090155)
- Etanol (EtOH) al 100 % (200 proof), para biología molecular
- Agua sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa

Reactivos de posamplificación

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (Illumina n.º de catálogo 20028871)

- NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
- NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
- NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
- Etanol al 100 % (200 proof), de biología molecular
- Agua sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa

Almacenamiento y manipulación de reactivos

Las siguientes cajas de reactivos se envían congeladas. Almacenamiento a entre -25 °C y -15 °C.

Caja	Número de referencia	Zona del laboratorio
TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze)	20031118	Preamplificación
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Preamplificación
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Preamplificación
TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze)	20031121	Posamplificación
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Posamplificación
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Preamplificación
TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze)	20140115	Posamplificación
TruSight Oncology Comp HRD Content Set	20140117	Posamplificación

Las siguientes cajas de reactivos se envían en paquetes de gel para mantenerlos a entre 0 °C y 10 °C. Almacenamiento a entre 2 °C y 8 °C.

Caja	Número de referencia	Zona del laboratorio
TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate)	20031119	Preamplificación
TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate)	20031123	Posamplificación
TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate)	20140116	Posamplificación



PRECAUCIÓN

No almacene los reactivos en una unidad de almacenamiento sin congelación ni en los compartimentos de la puerta del refrigerador.



PRECAUCIÓN

No congele las bolas que contengan reactivos (LNB1, SPB y SMB).

- Los cambios en el aspecto físico de los reactivos proporcionados pueden señalar el deterioro de los materiales. Si se producen cambios en el aspecto físico (tales como cambios en el color del reactivo o un aspecto turbio), no use los reactivos.
- ERA1-B y TCB1 pueden tener partículas relacionadas con el producto. Siga las directrices de manipulación específicas para cada reactivo.
- Se ha evaluado la estabilidad del ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) y se ha demostrado el rendimiento del kit para un máximo de cuatro usos. Los reactivos son estables si se almacenan a las temperaturas indicadas hasta la fecha de caducidad especificada que se incluye en la etiqueta de la caja.

Materiales y equipo

Materiales y equipo necesarios, no suministrados

Materiales y equipo de preamplificación

Equipo	Proveedor
Ultrasonicador con accesorios asociados Consulte Ajustes de configuración del ultrasonicador para la fragmentación del ADN , en la página 20.	Proveedor de laboratorio general
Agitadora vorticial	Proveedor de laboratorio general
Estaciones de incubación de micromuestras (2) con espacio para placas MIDI de 96 pocillos (2)	Proveedor de laboratorio general
Microcentrifugado	Proveedor de laboratorio general
Centrífuga de placas con las siguientes especificaciones: • Compatible con microplacas de 96 pocillos • Capacidad de 280 × g (+/- 10 %)	Proveedor de laboratorio general
Agitador de placas con las siguientes especificaciones: • Órbita de 2 mm • Agitación a 1200 rpm y 1800 rpm	Proveedor de laboratorio general
Rodillo o cuña de sellado	Proveedor de laboratorio general
Soporte magnético con las especificaciones siguientes: • Diseñado para la precipitación/separación con bolas paramagnéticas • Imanes en el lateral del soporte (no en la parte inferior) • Compatible con placas MIDI de 96 pocillos	Proveedor de laboratorio general

Equipo	Proveedor
Pipetas de precisión capaces de administrar con precisión volúmenes de entre 2 µl a 1000 µl con las especificaciones siguientes: • Pipeta de canal único o multicanal con un incremento de 0,02 µl • Pipeta de canal único o multicanal con un incremento de 0,1 µl, 0,2 µl o 0,5 µl • Pipeta de canal único o multicanal con un incremento de 1 µl o 2 µl Las pipetas deben calibrarse regularmente y tener una precisión del 5 % con respecto al volumen indicado.	Proveedor de laboratorio general
Pipeteador	Proveedor de laboratorio general
Bloque frío o de hielo	Proveedor de laboratorio general
Pipetas serológicas de 10 ml	Proveedor de laboratorio general
Sellos adhesivos para placas de 96 pocillos con las siguientes especificaciones: • Desprendible • Adecuado para placas de PCR con faldón o semifaldón • Adhesivo resistente que aguanta varios cambios de temperatura de -20 °C a 100 °C • Sin ribonucleasa ni desoxirribonucleasa	Proveedor de laboratorio general
Tubos de microcentrifugado con capacidad de 1,7 ml, libres de nucleasas	Proveedor de laboratorio general
Depósitos de reactivos libres de nucleasas (cubeta desechable, 50 ml) (o equivalente)	Proveedor de laboratorio general
Tubos cónicos de 15 ml	Proveedor de laboratorio general
Tubos cónicos de 50 ml	Proveedor de laboratorio general
Compatible con puntas de pipeta resistentes a los aerosoles	Proveedor de laboratorio general
Placas de almacenamiento de 96 pocillos, 0,8 ml (placas MIDI)	Fisher Scientific, n.º de referencia AB-0859 o equivalente
Compatible con placas de PCR de 96 pocillos, 0,2 ml (pocillos de polipropileno)	Proveedor de laboratorio general

Materiales y equipo de posamplificación

Equipo	Proveedor
Instrumento NextSeq 550Dx	Illumina, n.º de catálogo 20005715
Centrífuga de placas con las siguientes especificaciones: - Compatible con microplacas de 96 pocillos - Capacidad de 280 × g (+/- 10 %)	Proveedor de laboratorio general
Ciclador térmico con las especificaciones siguientes: - Tapa calefactada (100 °C) - Comprende un intervalo de temperatura de 4 °C a 99 °C - Precisión de temperatura de ±0,25 °C - Compatible con placas de PCR de 96 pocillos, 0,2 ml - Consulte Tasa de incremento del termociclador, en la página 22.	Proveedor de laboratorio general
Agitadora vorticial	Proveedor de laboratorio general
Estación de incubación de micromuestras con espacio para placas MIDI de 96 pocillos	Proveedor de laboratorio general
Bloque de calor seco con las especificaciones siguientes: - Intervalo de temperatura de 25 °C a 99 °C - Precisión de temperatura de ±5 °C - Asegúrese de que los tubos de microcentrifuga sean compatibles con el termobloque	Proveedor de laboratorio general
Agitador de placas con las siguientes especificaciones: - Órbita de 2 mm - Agitación a 1200 rpm y 1800 rpm	Proveedor de laboratorio general
Microcentrifugado	Proveedor de laboratorio general
Rodillo o cuña de sellado	Proveedor de laboratorio general
Soporte magnético con las especificaciones siguientes: - Diseñado para la precipitación/separación con bolas paramagnéticas - Imanes en el lateral del soporte (no en la parte inferior) - Compatible con placas MIDI de 96 pocillos	Proveedor de laboratorio general

Equipo	Proveedor
Pipetas de precisión capaces de administrar con precisión volúmenes de entre 2 µl a 1000 µl con las especificaciones siguientes: • Pipeta de canal único o multicanal con un incremento de 0,02 µl • Pipeta de canal único o multicanal con un incremento de 0,1 µl, 0,2 µl o 0,5 µl • Pipeta de canal único o multicanal con un incremento de 1 µl o 2 µl Las pipetas deben calibrarse regularmente y tener una precisión del 5 % con respecto al volumen indicado.	Proveedor de laboratorio general
Pipeteador	Proveedor de laboratorio general
Pipetas serológicas de 10 ml	Proveedor de laboratorio general
Sellos adhesivos para placas de 96 pocillos con las siguientes especificaciones: • Desprendible • Adecuado para placas de PCR con faldón o semifaldón • Adhesivo resistente que aguanta varios cambios de temperatura de -20 °C a 100 °C • Sin ribonucleasa ni desoxirribonucleasa	Proveedor de laboratorio general
Tubos de microcentrifugado con capacidad de 2 ml, libres de nucleasas	Proveedor de laboratorio general
Tubos de microcentrifugado con capacidad de 1,7 ml, libres de nucleasas	Proveedor de laboratorio general
Depósitos de reactivos libres de nucleasas (cubeta desechable, 50 ml) (o equivalente)	Proveedor de laboratorio general
Tubos cónicos de 15 ml	Proveedor de laboratorio general
Tubos cónicos de 50 ml	Proveedor de laboratorio general
Compatible con puntas de pipeta resistentes a los aerosoles	Proveedor de laboratorio general
Placas de almacenamiento de 96 pocillos, 0,8 ml (placas MIDI)	Fisher Scientific, n.º de referencia AB-0859 o equivalente
Compatible con placas de PCR de 96 pocillos, 0,2 ml (pocillos de polipropileno)	Proveedor de laboratorio general

Equipo	Proveedor
Bloque frío o de hielo	Proveedor de laboratorio general

Ajustes de configuración del ultrasonificador para la fragmentación del ADN

La fragmentación o el recorte del ADN influye en el rendimiento del ensayo al determinar la distribución del tamaño de los fragmentos, que a su vez afecta a la cobertura de la secuenciación. Se evaluaron y optimizaron varias configuraciones de ultrasonidos focalizados para el ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) ([Tabla 2](#)).

- El tiempo de recorte se ajustó para maximizar el criterio de medición MEDIAN_EXON_COVERAGE indicado en [Control de calidad, en la página 72](#). Los tiempos de recorte (consulte la [Tabla 2](#)) y los resultados de MEDIAN_INSERT_SIZE difirieron entre las configuraciones.
- Las configuraciones 1 a 4 y 6 se analizaron con tubos de vidrio de 8 tiras. La configuración 5 utilizó un único tubo de vidrio. Las capacidades de volumen del tubo se muestran en [Tabla 2](#).
- La optimización de las configuraciones 3 a 6 (volumen de baño de agua más pequeño) utilizó impulsos.
- Las configuraciones 3 a 5 se recortaron en tubos de menor volumen. Las capacidades de volumen del tubo afectan a los parámetros de recorte.
- La configuración 4 (transductor de línea, volumen de baño de agua de tamaño medio, agua desgasificada) requería un tiempo de retardo de pulso largo (40 segundos) para lograr una MEDIAN_EXON_COVERAGE similar a la configuración 1 y 2 a una entrada nominal de 40 ng.
- Los ajustes óptimos para la configuración 3 dieron como resultado una distribución del tamaño de los fragmentos ligeramente mayor en comparación con las otras configuraciones (MEDIAN_INSERT_SIZE era superior en aproximadamente 5 a 10 pares de bases).
- Las configuraciones 3 y 5 utilizaban agua no desgasificada y los tamaños de baño de agua más pequeños.
- Las configuraciones 3 y 5 necesitaban una entrada de ADN aumentada (50 ng para la configuración 3, 60 ng para la configuración 5) para lograr una MEDIAN_EXON_COVERAGE similar a las otras 4 configuraciones, que utilizaban la entrada nominal de 40 ng.
- Las configuraciones 3 y 5 presentan más daños o desnaturalización y, por lo tanto, una masa efectiva reducida de moléculas de ADNbc que se pueden usar en la preparación de genotecas.

Centrifugue los tubos de recorte durante el proceso de recuperación para garantizar que se recupere el volumen especificado, ya que cualquier pérdida de material puede afectar negativamente al rendimiento.

Tabla 2 Configuraciones de ultrasonificador focalizado evaluadas

Parámetro	Configuración					
	1	2	3	4	5	6
Transductor	Línea	Punto	Punto	Línea	Punto	Línea
Volumen de baño de agua	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Agua desgasificada	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí
Refrigerador de agua	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Temperatura de baño de agua	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Potencia incidente máxima (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% de factor de trabajo	30	10	30	25	20	25
Ciclos por ráfaga	200	200	1000	1000	1000	600 ⁵
Pulsación (ráfagas de 10 segundos)	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Tiempo de retardo de pulsación	N/A	N/A	10 s	40 s	10 s	10 s
Tiempo de recorte	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Procesamiento de muestras	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Tamaño del lote	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Tamaño de muestra del tubo de vidrio de 8 tiras	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Tubo único (50 µl)	130 µl (o placa de 96 microTUBOS)
Tramado	N/A	N/A	N/A	3 mm Y a 20 mm/s	N/A	1,5 mm Y a 10 mm/s
Equivalente de entrada de ADN (para mediana de cobertura de exones)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ El tiempo de recorte de 200 segundos consiste en ráfagas de 10 segundos con 20 repeticiones.

² El tiempo de recorte de 320 segundos consiste en ráfagas de 10 segundos con 32 repeticiones.

Tasa de incremento del termociclador

Se recomienda la optimización de la tasa de incremento del termociclador. Por ejemplo, un modelo analizado se ajustó pasando de una tasa de incremento predeterminada (y máxima) de 5 °C/s a 3 °C/s para lograr resultados similares a los de otros modelos con tasas de incremento predeterminadas más bajas.

Recopilación, transporte y almacenamiento de muestras

Siga los procedimientos habituales a la hora de recopilar, transportar, almacenar y procesar muestras.

Requisitos de la muestra

Tejido FFPE

El ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) requiere 40 ng de ADN extraído del tejido FFPE ovárico, de las trompas de Falopio o peritoneal primario. El tejido debe fijarse con un fijador de formol adecuado para análisis moleculares; por ejemplo, formol al 10 % neutro tamponado. El tejido no debe descalcificarse. Antes de realizar el ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN), un patólogo debe examinar la muestra de tejido para garantizar que es adecuada para esta prueba. Se requiere un mínimo del 20 % de contenido tumoral (por superficie) para detectar mutaciones somáticas conductoras. Se requiere un mínimo del 33 % de contenido tumoral (por superficie) para detectar GIS.

Para una alta probabilidad de extraer 40 ng de ADN, el volumen de tejido recomendado es $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Este volumen es equivalente a un área de tejido viable acumulada de $\geq 200 \text{ mm}^2$ utilizando secciones de $5 \text{ }\mu\text{m}$ de grosor, o $\geq 100 \text{ mm}^2$ utilizando secciones de $10 \text{ }\mu\text{m}$ de grosor. La superficie de tejido acumulado es la suma de la superficie de tejido viable en todas las secciones sometidas a la extracción. Por ejemplo, una superficie de tejido acumulado de 200 mm^2 puede obtenerse mediante la extracción de cuatro secciones de $5 \text{ }\mu\text{m}$ con una superficie de tejido de 50 mm^2 cada una o cinco secciones de $10 \text{ }\mu\text{m}$ con una superficie de tejido de 20 mm^2 cada una. La necrosis tisular puede reducir el rendimiento de ácido nucleico. Para reducir al mínimo la posibilidad de que se generen negativos falsos, el tejido se puede macrodisecionar para eliminar el tejido necrótico y alcanzar un contenido tumoral viable.

El tejido de FFPE montado en portaobjetos se puede almacenar durante un máximo de 28 días a temperatura ambiente.

Extracción, cuantificación y almacenamiento de ácido nucleico

- Extraiga el ADN de las muestras de tejido FFPE; para ello, use los kits de extracción disponibles en el mercado. Las diferencias en los kits de extracción pueden afectar al rendimiento. Consulte [Evaluación del kit de extracción de ácido nucleico](#), en la página 97.
- Almacene la reserva de ácido nucleico extraído; para ello, siga las instrucciones del fabricante del kit de extracción.
- Conservar el ADN extraído durante un máximo de 28 días entre $-25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Para evitar cambios en la concentración a lo largo del tiempo, mida el ADN en los 28 días siguientes al inicio de la preparación de genotecas. Cuantifique el ADN con un método de cuantificación fluorométrica que use fluoróforos de unión de ácido nucleico. La concentración de ácido nucleico debe ser la media de al menos tres mediciones.
- El ensayo requiere 40 ng de cada muestra de ADNg con una concentración de extracción mínima de 3,33 ng/μl. El recorte requiere un volumen final de 52 μl (0,77 ng/μl) con un mínimo de 40 μl de TEB (se proporciona) que se usa como diluyente.

Almacenamiento de genotecas

Almacene genotecas en placas de PCR de unión baja durante un intervalo de 7 a 32 días, según el tipo de genoteca (consulte la [Tabla 3](#)).

Tabla 3 Tiempos de almacenamiento de genotecas

Tipo de genoteca	Placa	Número de días	Temperatura de almacenamiento
ADNg fragmentado	PCR de LP	≤7	Entre -25 °C y -15 °C
Enriquecimiento previo	PCR de ALS	≤30	Entre -25 °C y -15 °C
Enriquecimiento posterior	PCR de ELU2	≤7	Entre -25 °C y -15 °C
PCR de enriquecimiento posterior	PCR de PL	≤30	Entre -25 °C y -15 °C
Normalizada	PCR de NL	≤32	Entre -25 °C y -15 °C

Advertencias y precauciones

Seguridad



ADVERTENCIA

Este conjunto de reactivos contiene sustancias químicas que pueden ser peligrosas. Evite su inhalación, su ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que pueden provocar lesiones. La ventilación debe ser adecuada para la manipulación de materiales peligrosos en los reactivos. Utilice un equipo de protección, incluidos gafas, guantes y batas de laboratorio adecuados para el riesgo de exposición. Manipule los reactivos usados como residuos químicos y deséchelos de conformidad con las normativas y leyes regionales, nacionales y locales aplicables. Para obtener más información sobre seguridad, salud y medioambiente, consulte la SDS en support.illumina.com/sds.html.

- Algunos componentes de este ensayo contienen formamida, una amida alifática que es carcinógena y probablemente tóxica para la reproducción. Evite su inhalación, su ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que pueden provocar lesiones. Utilice un equipo de protección que incluya protección ocular, guantes y bata de laboratorio. Manipule los reactivos usados como residuos químicos y deséchelos según se establece en las normativas de seguridad oficiales de su zona. Si desea obtener más información sobre seguridad, salud y medioambiente, consulte la SDS; para ello, busque el código de producto en support.illumina.com/sds.html (Para obtener más información, consulte [Reactivos suministrados, en la página 5](#)).
- Algunos componentes de este ensayo contienen 2-mercaptoetanol, un agente reductor. Evite su inhalación, su ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que pueden provocar lesiones. Utilícelo en una zona bien ventilada y deseche los contenedores y los contenidos no utilizados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona. Si desea obtener más información sobre seguridad, salud y medioambiente, consulte la SDS; para ello, busque el código de producto en support.illumina.com/sds.html (Para obtener más información, consulte [Reactivos suministrados, en la página 5](#)).
- Algunos componentes de este ensayo contienen hidróxido de sodio, una base altamente corrosiva. Evite su inhalación, su ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que pueden provocar lesiones. Utilice un equipo de protección que incluya protección ocular, guantes y bata de laboratorio. Manipule de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio y deseche de conformidad con las leyes y normativas regionales, nacionales y locales aplicables. Si desea obtener más información sobre seguridad, salud y medioambiente, consulte la SDS; para ello, busque el código de producto en support.illumina.com/sds.html (Para obtener más información, consulte [Reactivos suministrados, en la página 5](#)).
- Algunos componentes de este ensayo (EPM) contienen cloruro de tetrametilamonio, un tóxico agudo, irritante cutáneo y contaminante marino. Evite su inhalación, su ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que pueden provocar lesiones. Utilice un equipo de protección que incluya protección ocular, guantes y bata de laboratorio. Manipule de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio y deseche de conformidad con las leyes y normativas regionales, nacionales y locales aplicables. Si desea obtener más

información sobre seguridad, salud y medioambiente, consulte la SDS; para ello, busque el código de producto en support.illumina.com/sds.html (Para obtener más información, consulte [Reactivos suministrados, en la página 5](#)).

- Manipule todas las muestras como si fueran infecciosas.
- Utilice las precauciones habituales del laboratorio. No pipetee con la boca. No coma, beba ni fume en las zonas de trabajo designadas. Use guantes desechables y batas de laboratorio para la manipulación de muestras y reactivos del ensayo. Lávese bien las manos tras la manipulación de muestras y reactivos del ensayo.
- Comunique de inmediato cualquier incidente grave relacionado con este producto a Illumina y las autoridades competentes de los Estados miembros en los que se encuentren el usuario y el paciente.

Laboratorio

- Para evitar que se produzca contaminación, disponga en el laboratorio un flujo de trabajo unidireccional. Las zonas de preamplificación y posamplificación deben contar con equipo y material específicos (por ejemplo, pipetas, puntas de pipeta, vórtex y una centrífuga). Para evitar el arrastre de sondas o del producto de amplificación, evite volver a la zona de preamplificación después de entrar en la zona de posamplificación.
- Realice los pasos de indexación de PCR y enriquecimiento en una zona de posamplificación para evitar el arrastre del producto de amplificación.
- Los procedimientos de preparación de genotecas requieren un entorno libre de ribonucleasa/desoxirribonucleasa. Descontamine a fondo las zonas de trabajo con una solución de limpieza que inhiba la ribonucleasa/desoxirribonucleasa. Use plásticos certificados que estén libres de desoxirribonucleasa, ribonucleasa y ADN genómico humano.
- Para los procedimientos de posamplificación, limpie las superficies de trabajo y el equipo a fondo antes y después de cada procedimiento con una solución nueva de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0,5 %. Deje que la solución entre en contacto con las superficies durante 10 minutos y, a continuación, limpie a fondo con un paño empapado en alcohol etílico al 70 % o alcohol isopropílico.
- Use tubos de microcentrífuga, placas, puntas de pipeta y depósitos libres de nucleasas.
- Use un equipo calibrado durante todo el ensayo. Asegúrese de calibrar el equipo a las velocidades, temperaturas y volúmenes especificados en este protocolo.
- Use pipetas de precisión para garantizar la administración precisa tanto del reactivo como de la muestra. Calibre de forma periódica según las especificaciones del fabricante.
- Use las siguientes directrices a la hora de usar las pipetas multicanal:
 - Pipetee un mínimo de ≥ 2 μ l.
 - Asegúrese de que las puntas de barrera encajen debidamente y que sean adecuadas para la marca y el modelo de la pipeta multicanal.
 - Fije las puntas con un movimiento giratorio para asegurarse de que todas queden fijadas correctamente.

- aspire en un ángulo de 90°, con niveles de líquido de volumen iguales en todas las puntas.
- Mezcle todos los componentes después de la entrega pipeteando la mezcla de reacción arriba y abajo.
- Después de la dispensación, asegúrese de que el líquido se haya dispensado por completo de cada punta.
- Asegúrese de usar el equipo especificado para el ensayo y de ajustar los programas según se indica.
- Las temperaturas especificadas para el termociclador y la estación de incubación de micromuestras indican la temperatura de reacción, no necesariamente la temperatura ajustada del equipo.

Ensayo

- Evite la contaminación cruzada.
 - Siga las prácticas de laboratorio adecuadas a la hora de manipular muestras y reactivos.
 - Use instrumentos de laboratorio consumibles nuevos y puntas de pipeta nuevas entre las muestras y entre dispensaciones de reactivos.
 - Utilice puntas resistentes a los aerosoles para reducir el riesgo de contaminación cruzada.
 - Use un flujo de trabajo unidireccional cuando pase de zonas de preamplificación a otras de posamplificación.
 - Manipule y abra solamente un cebador de índice a la vez. Tape cada tubo de índice inmediatamente después de su uso. El kit incluye tapas adicionales.
 - Cámbiese de guantes con frecuencia y si estos entran en contacto con los cebadores de índice o con las muestras.
 - Retire los tubos de cebadores de índice sin usar de la zona de trabajo.
 - No vuelva a almacenar los tubos de reactivos después de su uso con una gradilla de tubos, una cubeta o un depósito.
 - Mezcle las muestras con una pipeta y centrifugue la placa cuando se indique.
 - Utilice un agitador de microplacas. No agite las placas en vórtex.
- No intercambie los componentes del ensayo de lotes de kits de reactivos distintos. Los lotes de kits de reactivos están identificados en la etiqueta de la caja del kit de reactivos y en la hoja de lotes maestra.
- Se precisan prácticas de laboratorio adecuadas para evitar que las nucleasas y los productos de PCR contaminen los reactivos, los instrumentos, las muestras y las genotecas. La contaminación de nucleasas y productos de PCR puede dar lugar a resultados imprecisos y poco fiables.
- Para un almacenamiento y un rendimiento del ensayo óptimos, es preciso usar el tipo de placa adecuado. Asegúrese de seguir las instrucciones para la transferencia de placas en las [Instrucciones de uso, en la página 37](#).
- El incumplimiento de los procedimientos descritos puede provocar resultados erróneos o una reducción considerable de la calidad de las genotecas.

- A menos que se haya indicado un punto de parada de seguridad en [Instrucciones de uso, en la página 37](#), continúe inmediatamente con el siguiente paso.
- Almacene los reactivos o los componentes del ensayo a la temperatura especificada en las zonas de pre-amplificación y pos-amplificación designadas.
- No almacene los reactivos en una unidad de almacenamiento sin congelación ni en los compartimentos de la puerta del refrigerador.
- No congele las bolas que contengan reactivos (LNB1, SPB y SMB).
- No use reactivos que se hayan almacenado incorrectamente.
- No se desvíe de los procedimientos de mezcla y manipulación especificados para cada reactivo. Mezclar incorrectamente los reactivos o agitarlos en vórtex de forma excesiva puede provocar resultados erróneos para las muestras.
- Los reactivos ERA1-B y TCB1 pueden tener partículas relacionadas con el producto. Siga las directrices de manipulación para cada reactivo específico.
- Prepare mezclas maestras nuevas y deseche el volumen restante después de su uso.
- Para los pasos de lavado, prepare siempre etanol nuevo al 80 % con agua sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa. El etanol puede absorber agua del aire, lo que podría afectar a los resultados. Deseche el etanol al 80 % después de su uso en virtud de la regulación local, estatal o federal.
- Transfiera el volumen especificado de eluido. Transferir una cantidad inferior al volumen especificado de eluido durante los pasos de elución puede afectar a los resultados.
- Use las siguientes directrices para los ultrasonificadores. Asegúrese de seguir las instrucciones del fabricante.
 - Cargue el ADNg en el tubo del ultrasonificador lentamente para evitar que se formen burbujas. Un exceso de burbujas o la formación de cámaras de aire en el tubo de corte puede ocasionar una fragmentación incompleta.
 - Dispense en los tubos de ultrasonificador lentamente y evite que se produzcan salpicaduras.
 - Para impedir el desplazamiento de líquidos y la pérdida de muestra, no inserte la punta de la pipeta en la parte inferior del tubo de ultrasonificador cuando retire el ADN fragmentado.
- No pipetee menos de 2 µl de entrada de muestras.
- No use una cubeta para dispensar reactivos para los pasos que requieran menos de 10 µl de material para añadir a cada pocillo de muestra.
- Use una pipeta de punta fina al transferir las muestras de ADNg fragmentado de los tubos del ultrasonificador a la placa de preparación de genotecas (LP).
- Utilice únicamente adaptadores UMI.
- No utilice adaptadores SUA1.
- Asigne cebadores de índices diferentes a cada muestra para identificar cada genoteca cuando se agrupen para la secuenciación en una única celda de flujo.

- Se pueden utilizar índices UPxx o índices CPxx.
- No combine cebadores de índices CPxx y UPxx en la misma genoteca.
- Las discrepancias entre las muestras y los cebadores de índice generan informes con resultados incorrectos debido a que no se identifican las muestras positivas. Introduzca los ID de las muestras y asigne los índices en Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN) analysis module antes de empezar a preparar las genotecas. Haga un registro de los ID de las muestras, de la indexación y de la orientación del pocillo de la placa para poder consultar esta información durante la preparación de genotecas.
- Secuencie un máximo de 16 genotecas de ADN por celda de flujo. Secuencie seis genotecas como mínimo. Siga las directrices de [Número de genotecas y selección de índices, en la página 33](#).
- A continuación del paso de unión en [1.ª captura de las regiones de interés, en la página 53](#) y [2.ª captura de las regiones de interés, en la página 57](#), proceda a realizar el paso de lavado para evitar que se sequen las microesferas de bolas.
- Durante los pasos de lavado, retire todo el etanol al 80 % de la parte inferior de los pocillos. Los restos de etanol pueden afectar los resultados.
- Para un rendimiento óptimo del ensayo, siga el número de lavados especificados indicados en [Instrucciones de uso, en la página 37](#).
- Durante el procedimiento de [Normalización de las genotecas, en la página 63](#), resuspenda completamente las microesferas de bolas de la genoteca para lograr una densidad de grupos uniforme en la celda de flujo.
- Las genotecas de ADN de la misma muestra están enriquecidas con dos conjuntos de sondas diferentes, pero utilizan el mismo índice y deben secuenciarse en la misma celda de flujo.
- Los controles positivos y el control sin plantilla (NTC) deben procesarse como una muestra y fragmentarse para el enriquecimiento con ambos conjuntos de sondas.

Notas del procedimiento

- El flujo de trabajo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) se puede realizar de acuerdo con el siguiente programa:
 - Día 1: Fragmentación de ADN de las muestras de ADNg, preparación de genotecas e inicio de la (primera) hibridación durante la noche.
 - Día 2: Enriquecimiento, normalización de las genotecas enriquecidas y carga de genotecas en el Instrumento NextSeq 550Dx.

Si no es posible realizar el flujo de trabajo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) de acuerdo con este programa, se especifican varios puntos de detención de seguridad a lo largo del protocolo. A menos que se haya especificado un punto de detención de seguridad en el protocolo, continúe inmediatamente con el siguiente paso.

- Las genotecas derivadas del ADN se dividen en pocillos separados para el enriquecimiento simultáneo con el juego de sondas OPD2 y el juego de sondas OPD3. Los controles positivos y los NTC deben seguir el mismo procedimiento.
- Utilice los componentes de TruSight Oncology Comp Enrichment (n.º de referencia 20031123, n.º de referencia 20031121) con OPD2 del TruSight Oncology Comp Content Set (n.º de referencia 20031122). Las genotecas enriquecidas con OPD2 se denominan genotecas de ADN.
- Utilice los componentes de TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (n.º de referencia 20140116, n.º de referencia 20140115) con OPD3 del TruSight Oncology Comp HRD Content Set (n.º de referencia 20140117). Las genotecas enriquecidas con OPD3 se denominan genotecas de ADN HRD.
- Las tablas de preparación de mezcla maestra incluyen un excedente de volumen para asegurarse de que haya un volumen suficiente para el número de muestras que se están procesando.
- Use agua de grado molecular que esté libre de nucleasas.
- Después de añadir el reactivo, enjuague la punta aspirando y dispensando una vez en el pocillo correspondiente de la placa, a no ser que se indique otra cosa en el procedimiento.
- La temperatura ambiente se define como la temperatura que varía entre 15 °C y 30 °C.
- Los reactivos, las muestras o las genotecas deben mantenerse en frío durante determinados pasos de las instrucciones de uso. Esto se define como mantener en hielo o equivalente.

Programas del termociclador

- Programe los programas del termociclador en los equipos de posamplificación antes de iniciar el protocolo.
- Asegúrese de que las placas de PCR encajen perfectamente en el termociclador.
- Use las placas recomendadas por el fabricante del termociclador.

Sellado y retirada del sello de la placa

- Selle siempre las placas con un sello adhesivo para placas nuevo. No reutilice los sellos.
- Para sellar la placa, aplíquelo con seguridad la cubierta adhesiva con una cuña o un rodillo de sellado.
- Selle siempre la placa de 96 pocillos con un sello de placa adhesivo nuevo antes de llevar a cabo los siguientes pasos del protocolo:
 - Pasos de agitación de placas
 - Pasos de centrifugación
 - Pasos de termociclado
 - Hibridaciones
 - Almacenamiento prolongado
- Asegúrese de que los bordes y los pocillos estén sellados para reducir el riesgo de contaminación cruzada y evaporación.
- Coloque la placa en una superficie plana antes de retirar lentamente el sello.

- Antes de retirar el sello, si observa líquidos o condensación en el sello o en las paredes laterales de los pocillos de las placas, centrifugue a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- Use sellos adhesivos para placas que sean eficaces a una temperatura entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ y que sean aptos para placas de PCR con faldón o semifaldón.

Equipo

- Asegúrese de que el personal de laboratorio esté familiarizado con las instrucciones del fabricante para operar y mantener todo el equipo antes de iniciar el ensayo.

Tipo de placa y transferencias de placas

- Para un almacenamiento y un rendimiento del ensayo óptimos, es preciso usar el tipo de placa adecuado.
- Cuando transfiera volúmenes entre placas, transfiera el volumen especificado desde cada pocillo de una placa al pocillo correspondiente de la placa de destino.
- Puede usar pipetas multicanal cuando transfiera muestras entre placas o gradillas de tubos.
- A la hora de agitar las placas, siga las directrices que se indican a continuación.
 - Use un agitador de placas para agitar las placas. No agite las placas en vórtex.
 - Agite las placas de PCR a 1200 rpm.
 - Agite las placas MIDI a 1800 rpm.
 - Siga las instrucciones del fabricante para asegurarse de que el agitador de placas sostenga la placa de forma segura.

Centrifugación

- Cuando las instrucciones en el protocolo indiquen centrifugar brevemente, centrifugue a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- Si se observa líquido en el sello o en los laterales de un pocillo, centrifugue la placa a $280 \times g$ durante 1 minuto.

Manipulación de los reactivos

- Justo después de usarlos, vuelva a tapar todos los tubos de reactivos de modo que queden apretados para limitar la evaporación e impedir que se produzca contaminación.
- Devuelva los reactivos a la temperatura de almacenamiento especificada cuando ya no los necesite para un procedimiento.
- Siga la preparación de reactivos previa a la sección de cada procedimiento en las [Instrucciones de uso, en la página 37](#).
- Asegúrese de preparar el volumen requerido de mezcla maestra, mezcla de elución y etanol al 80 % para el número de muestras que esté procesando.

- Los volúmenes proporcionados en la mezcla maestra y las tablas de solución contienen excedente. Los cálculos del volumen excedente son los siguientes.
 - [Tabla 13](#)
 - Volumen de ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{número de genotecas}) \times (1,20)$.
 - Volumen de ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{número de genotecas}) \times (1,20)$.
 - [Tabla 23](#)
 - Volumen de EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{número de genotecas}) \times (1,364)$.
 - Volumen de HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{número de genotecas}) \times (1,364)$.
 - [Tabla 24](#)
 - Volumen de EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{número de genotecas}) \times (1,364)$.
 - Volumen de HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{número de genotecas}) \times (1,364)$.
 - [Tabla 30](#)
 - Volumen de LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{número de genotecas}) \times (2,0)$.
 - Volumen de LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{número de genotecas}) \times (2,0)$.
 - [Tabla 31](#)
 - Volumen de EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{número de genotecas}) \times (1,25)$.
 - Volumen de HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{número de genotecas}) \times (1,25)$.

Juegos de adaptadores

- Utilice únicamente adaptadores UMI.
- Se proporcionan adaptadores SUA1, pero no son necesarios para el ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

Manipulación de las bolas

- En el ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) se incluyen tres tipos de bolas (SPB, SMB y LNB1). Durante el procedimiento, asegúrese de usar el tipo de bola correcto.
- Realice el número correcto de lavados para cada tipo de bola.
- Asegúrese de que las bolas estén a temperatura ambiente antes de usarlas.
- Mezcle las bolas durante 1 minuto antes de usarlas para garantizar la homogeneidad.

- Aplique las siguientes directrices a la hora de mezclar las bolas con una pipeta:
 - Use una pipeta y un tamaño de punta adecuados para el volumen que vaya a mezclar.
 - Regule los ajustes de volumen a aproximadamente el 50-75 % del volumen de la muestra.
 - Pipetee lentamente sin liberar el émbolo.
 - Evite las salpicaduras y que entren burbujas.
 - Coloque la punta de la pipeta por encima de la microesfera y dispense directamente hacia la microesfera para liberar las bolas del pocillo o el tubo.
 - Asegúrese de que la microesfera de bolas esté completamente dentro de la solución. La solución debe ser de color marrón oscuro y presentar una consistencia homogénea.
 - Evalúe si hay una microesfera de bolas presente. Aspire con cuidado el volumen total de la solución de bolas del pocillo en la punta y mire hacia la parte inferior de los pocillos.
- Si se aspiran las bolas en las puntas de las pipetas durante los pasos de separación magnética, dispense las bolas en el pocillo de la placa con el soporte magnético. Espere hasta que el líquido se vuelva transparente (aproximadamente 2 minutos) antes de ir al siguiente paso del procedimiento.
- Cuando lave las bolas:
 - Use el soporte magnético recomendado para la placa.
 - Dispense el líquido directamente en la microesfera de bolas de manera que se humedezcan las bolas del lateral de los pocillos.
 - Mantenga la placa en el soporte magnético hasta que el procedimiento especifique que la retire.
 - No agite la placa mientras esté en el soporte magnético.
 - Mientras se encuentre en el soporte magnético, no altere la microesfera de bolas.
- Cuando lave bolas o retire el sobrenadante, incline las puntas de las pipetas hacia la parte inferior de los pocillos para evitar crear un vacío y conducir la solución a los filtros de las puntas de las pipetas.

Número de genotecas y selección de índices

Antes de configurar el experimento, planifique el número de genotecas y los índices de muestras para el experimento de secuenciación. Las siguientes guías sobre el número de muestras incluyen controles positivos, pero excluyen los NTC. Los NTC deben añadirse al experimento planificado como una muestra adicional.

Los cebadores de índice identifican únicamente cada muestra, de modo que las genotecas puedan agruparse conjuntamente para secuenciar en una celda de flujo. Los índices compatibles se muestran en la pantalla Create Run (Crear experimento) durante la configuración del experimento en el Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN) analysis module. Durante la preparación de genotecas, añada el cebador de índice en cada genoteca de muestras. *Use una mezcla de cebador de índice diferente para cada genoteca de muestras.*

Las genotecas indexadas de la misma muestra se dividen en dos enriquecimientos con dos conjuntos de sondas diferentes. Las dos genotecas enriquecidas resultantes comparten el mismo índice y deben secuenciarse en la misma celda de flujo.

Consulte la [Tabla 4](#) para conocer las genotecas mínimas y máximas para secuenciar en una celda de flujo durante la secuenciación.

Tabla 4 Secuenciación de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)

Tipo de genoteca	Enriquecimiento	Mínimo*	Máximo*
ADN	OPD2	3	8
ADN HRD	OPD3	3	8

* Los NTC no contribuyen a la plexicidad.

Para una utilización óptima de los reactivos a la hora de secuenciar en el Instrumento NextSeq 550Dx, secuencie 8 genotecas de ADN (OPD2) y 8 genotecas de ADN HRD (OPD3) por celda de flujo.

Asegúrese de que los cebadores de índice que use con las muestras coincidan con los índices que seleccione para el análisis con el Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN) analysis module. *Las discrepancias generan informes con resultados incorrectos debido a que no se identifican las muestras positivas.*

Existen dos tipos de índices (UPxx y CPxx) en el ensayo TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

Al secuenciar el número mínimo de genotecas (3 genotecas de ADN y 3 genotecas de ADN HRD), se aplican los siguientes requisitos:

- No use juegos de índices CPxx.
- Solo es necesario uno de los siguientes juegos de índices UPxx para proporcionar una diversidad suficiente:
 - UP01, UP02 y UP03
 - UP04, UP05 y UP06
 - UP07, UP08 y UP09
 - UP10, UP11 y UP12

Por ejemplo, a la primera genoteca se le asigna UP01, a la segunda genoteca UP02 y a la tercera genoteca UP03.

TruSight Oncology DNA Control v2

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) requiere el TruSight Oncology DNA Control v2 como control positivo. Incluya el TruSight Oncology DNA Control v2 para cada experimento de secuenciación de ADN en un acontecimiento de preparación de genotecas determinado. Un control positivo único se prepara para cada experimento secuenciado planeado. Consulte las Instrucciones de uso de TruSight Oncology DNA Control v2 (EU) para obtener más información.

La cantidad de TruSight Oncology DNA Control v2 de entrada es de 2 µl.

Incluya el NTC adecuado en cada acontecimiento de preparación de genoteca. El NTC se secuenciará repetidamente dentro de un acontecimiento de preparación de genotecas. Siga estas directrices para el control positivo y el NTC:

- Prepare las genotecas a partir de los controles positivos y NTC de forma idéntica a las muestras. El control positivo y el NTC deben fragmentarse para el enriquecimiento con ambos conjuntos de sondas de forma idéntica a las muestras.
- Use TEB para el DNA NTC (NTC de ADN).
- Los controles positivos están incluidos en el requisito de genoteca máximo.
- Los NTC no están incluidos en el requisito de genoteca mínimo.
- Use índices de UP para el NTC a la hora de secuenciar el número mínimo de genotecas.
- Puesto que el NTC se secuenciará repetidamente, el índice seleccionado para este control no puede repetirse en el acontecimiento de preparación de genotecas.

En las siguientes tablas se muestran diseños de placas de ejemplo para la preparación de genotecas ([Figura 1](#)). Cada columna numerada representa un experimento de secuenciación individual. El NTC se secuenciará para cada columna o conjunto de columnas.

Tabla 5 Placa de preparación de genotecas de un experimento único que incluye seis muestras del paciente

	1	2	3	4	5	6
A	Control pos. de ADN	vacío	vacío	vacío	vacío	vacío
B	ADN 1	vacío	vacío	vacío	vacío	vacío
C	ADN 2	vacío	vacío	vacío	vacío	vacío
D	ADN 3	vacío	vacío	vacío	vacío	vacío
E	ADN 4	vacío	vacío	vacío	vacío	vacío
F	ADN 5	vacío	vacío	vacío	vacío	vacío
G	ADN 6	vacío	vacío	vacío	vacío	vacío
H	DNA NTC (CONTROL NEGATIVO DE ADN)	vacío	vacío	vacío	vacío	vacío

Tabla 6 Placa de preparación de genotecas de tres experimentos que incluye 20 muestras de pacientes

	1	2	3	4	5	6	7
A	Control pos. de ADN	Control pos. de ADN	Control pos. de ADN	vacío	vacío	vacío	vacío
B	ADN 1	ADN 7	ADN 14	vacío	vacío	vacío	vacío
C	ADN 2	ADN 8	ADN 15	vacío	vacío	vacío	vacío
D	ADN 3	ADN 9	ADN 16	vacío	vacío	vacío	vacío
E	ADN 4	ADN 10	ADN 17	vacío	vacío	vacío	vacío
F	ADN 5	ADN 11	ADN 18	vacío	vacío	vacío	vacío
G	ADN 6	ADN 12	ADN 19	vacío	vacío	vacío	vacío
H	DNA NTC (CONTROL NEGATIVO DE ADN)	ADN 13	ADN 20	vacío	vacío	vacío	vacío

Instrucciones de uso

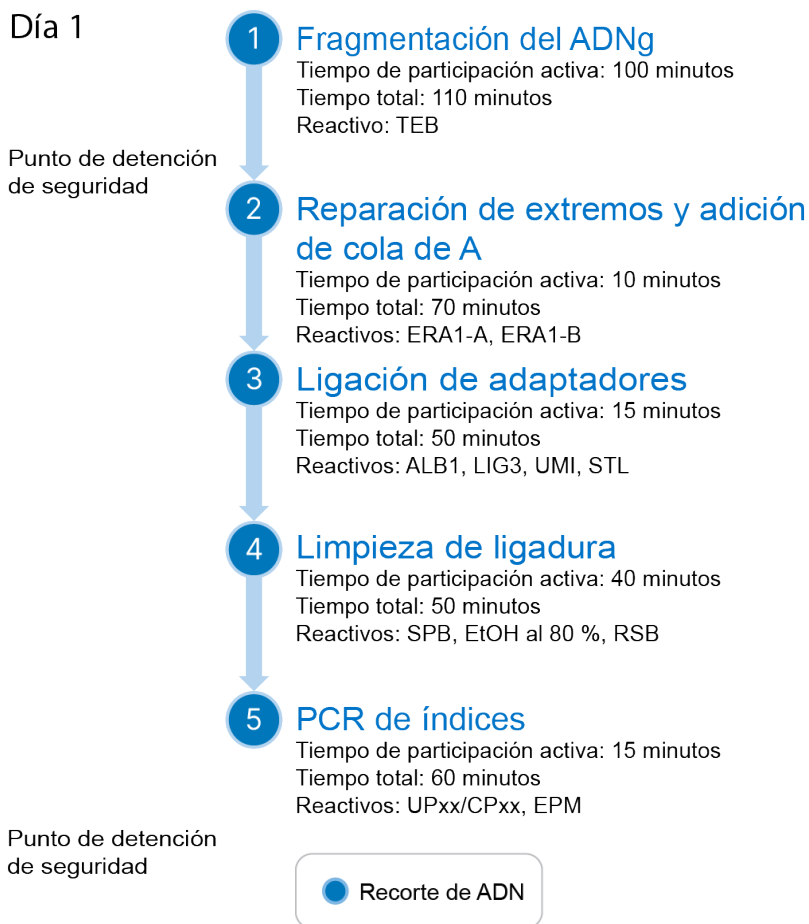
En la [Figura 1](#) y [Figura 2](#) se muestra un resumen del flujo de trabajo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

Flujo de trabajo de preparación de genotecas

La [Figura 1](#) muestra el flujo de trabajo de la preparación de genotecas para el TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Los controles positivos y los NTC se procesan de forma idéntica a las muestras. Los puntos de detención de seguridad se marcan entre los pasos.

Antes de iniciar el protocolo, introduzca la información del experimento y la muestra en el Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN) analysis module. Consulte *Guía de flujo de trabajo de Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) Analysis Module (n.º de documento 200080937)*.

Figura 1 Flujo de trabajo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) (parte 1)

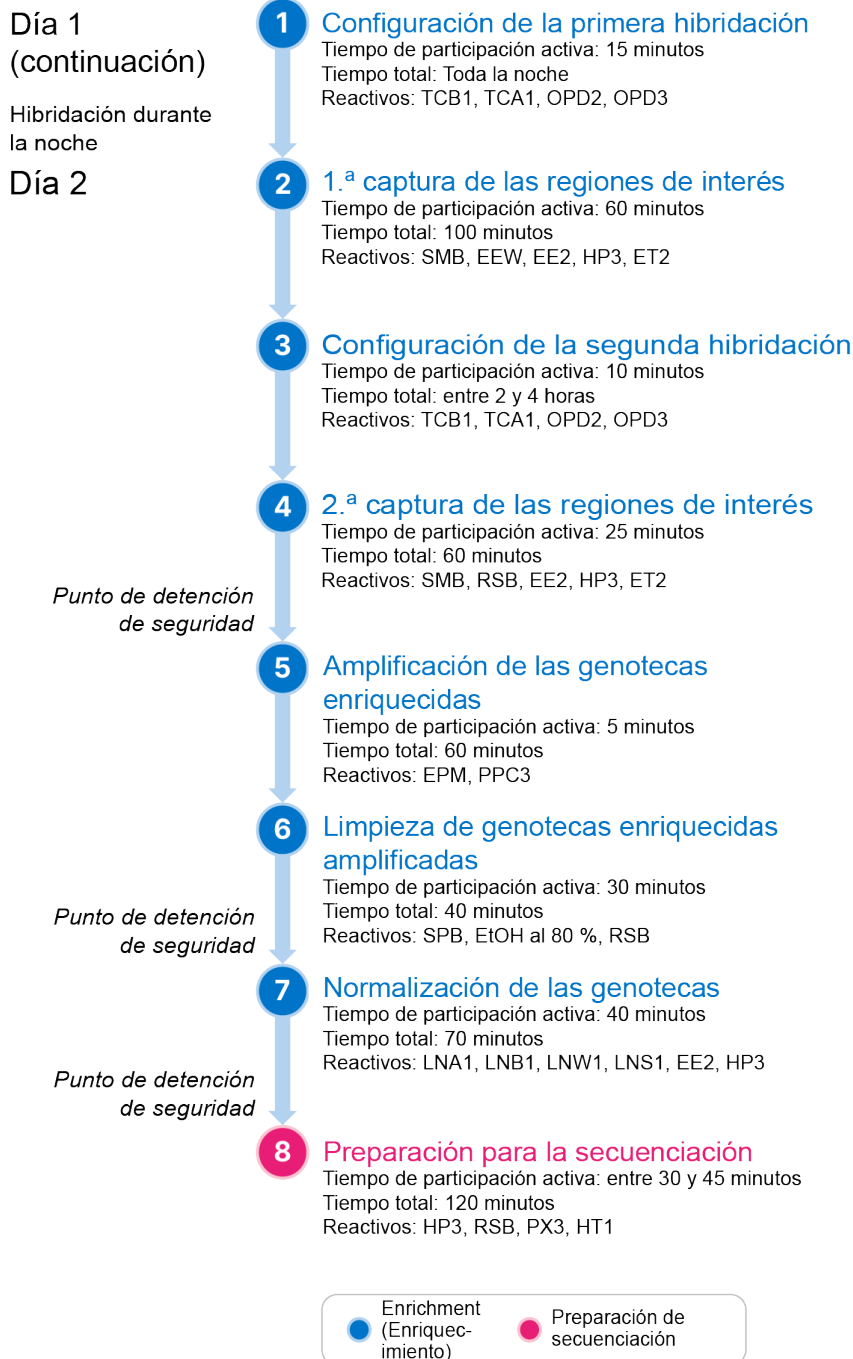


* Los tiempos de participación activa y los tiempos totales son aproximados.

Flujo de trabajo del enriquecimiento

La [Figura 2](#) muestra el flujo de trabajo del enriquecimiento. Los puntos de detención de seguridad se marcan entre los pasos.

Figura 2 Flujo de trabajo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) (parte 2)



Programación de los termocicladores

Antes de iniciar el ensayo, guarde los siguientes programas en termocicladores de posamplificación.

Tabla 7 Programas de termocicladores de posamplificación

Paso del procedimiento	Nombre del programa	Temperatura de la tapa	Volumen de la reacción	Parámetros del termociclador
PCR de índices	I-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C durante 30 segundos • 15 ciclos de: • 98 °C durante 10 segundos • 60 °C durante 30 segundos • 72 °C durante 30 segundos • 72 °C durante 5 minutos • Mantenga la temperatura a 10 °C
Realización de la primera hibridación	HYB1	100 °C	50 µl	• 95 °C durante 10 minutos • 85 °C durante 2 min y 30 segundos • 75 °C durante 2 min y 30 segundos • 65 °C durante 2 min y 30 segundos • Mantenga a 57 °C durante 8 a 24 horas
Realización de la segunda hibridación	HYB2	100 °C	50 µl	• 95 °C durante 10 minutos • 85 °C durante 2 min y 30 segundos • 75 °C durante 2 min y 30 segundos • 65 °C durante 2 min y 30 segundos • Mantenga a 57 °C durante 1,5 a 4 horas
Amplificación de las genotecas enriquecidas	EL-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C durante 30 segundos • 18 ciclos de: • 98 °C durante 10 segundos • 60 °C durante 30 segundos • 72 °C durante 30 segundos • 72 °C durante 5 minutos • Mantenga la temperatura a 10 °C

Preparación del protocolo

Esta preparación es necesaria para poder seguir los pasos del protocolo que conducen al siguiente punto de detención de seguridad.

**PRECAUCIÓN**

Todos los procedimientos del flujo de trabajo requieren un entorno libre de ribonucleasa/desoxirribonucleasa.

1. Descontamine a fondo las zonas de trabajo con una solución de limpieza que inhiba la ribonucleasa/desoxirribonucleasa.
2. Siga las instrucciones del fabricante para configurar el ultrasonificador.
3. Retire los controles de ADN del almacenamiento.
4. Retire el tubo de reactivos de la caja y siga las instrucciones de descongelación.

Tabla 8 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (n.º de referencia 20031119)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
TEB	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Fragmentación del ADNg

Fragmentación del ADNg

Este proceso fragmenta ADNg y genera fragmentos de ADNds con 3' y 5' protuberantes.

Preparación

1. Siga las recomendaciones de [Extracción, cuantificación y almacenamiento de ácido nucleico, en la página 23](#) para cuantificar las muestras.
2. Prepare el TEB: inviértalo o agítelo en vórtex para mezclar.

Procedimiento

Preparación de la placa

1. Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como LP (preparación de genotecas).
Si va a detenerse en el [PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD, en la página 41](#), utilice una placa de PCR.
2. Cubra y reserve para su uso en [Transferencia de ADN fragmentado, en la página 41](#).

Dilución del ADNg

1. Descongele las muestras de ADNg y los controles de ADN a temperatura ambiente.
2. Pipetee cada muestra de ADNg 10 veces para mezclar.
3. Centrifugue el tubo brevemente para recoger las gotas.
4. Invierta el TEB o agítelo en vórtex para mezclar.
5. Use el TEB para preparar cada muestra de ADNg en un volumen final de 52 µl. Consulte la siguiente tabla para ver las cantidades de entrada y las concentraciones mínimas en función del tipo de muestra.

- El ensayo requiere una concentración de extracción mínima para permitir al menos 40 µl de TEB del volumen de 52 µl.
- Para el control de ADN, utilice 2 µl en un volumen final de 52 µl.
- Para prevenir la pérdida de muestras, no pipetee menos de 2 µl de muestra en esta dilución.

Tipo de muestra	Cantidad de entrada (ng)	Concentración mínima (ng/µl)
FFPE	40	3.33
Control	40	20

Fragmentación

1. Añada 52 µl de cada muestra de ADNg a un pocillo separado del tubo del ultrasonicador.



PRECAUCIÓN

Cargue el ADNg en el tubo lentamente; asegúrese de que no se formen cámaras de aire en el fondo del tubo. Para obtener más información, consulte [Ensayo, en la página 27](#) y las instrucciones del fabricante.

2. Registre la orientación de la tira.
3. Fragmente el ADNg en fragmentos con el ultrasonicador.

Transferencia de ADN fragmentado

1. Asegúrese de que la disposición de la placa de muestras y los índices para cada muestra coincidan con el experimento que seleccione para el análisis con TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) analysis module.
2. Siga las instrucciones del fabricante del ultrasonicador para recuperar la muestra.
Para algunos tipos de tubo de ultrasonicador, es necesaria la centrifugación para consolidar la muestra en el tubo.
3. Para cada muestra de ADNg fragmentado, use una pipeta con puntas finas para realizar tres transferencias de 16,7 µl a un pocillo vacío de la placa de LP.
4. Aplique sello adhesivo para placas en la placa de LP.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si debe detener el procedimiento, aplique un sello adhesivo para placas en la placa de PCR de LP y centrifugue a 280 × g durante 1 minuto. Almacénela a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de 7 días.

Preparación del protocolo

Esta preparación es necesaria para poder seguir los pasos del protocolo que conducen al siguiente punto de detención de seguridad.

Asegúrese de ajustar los programas del termociclador de posamplificación. Consulte [Programación de los termocicladores, en la página 39](#).

1. Prepare una caja de hielo o equivalente.
2. Retire los tubos de reactivos de la caja y siga las instrucciones de descongelación.

Tabla 9 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (n.º de referencia 20031118)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
ERA1-A	Entre -25 °C y -15 °C	Manténgalo en frío.	Reparación de extremos y adición de cola de A
ERA1-B	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Reparación de extremos y adición de cola de A
ALB1	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Ligación de adaptadores
LIG3	Entre -25 °C y -15 °C	Manténgalo en frío.	Ligación de adaptadores
UMI (tapa blanca)	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Ligación de adaptadores
STL	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Ligación de adaptadores
EPM	Entre -25 °C y -15 °C	Manténgalo en frío.	PCR de índices

Tabla 10 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (n.º de referencia 20031119)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
SPB (etiqueta verde claro)	Entre 2 °C y 8 °C	Déjelo a temperatura ambiente durante 30 minutos.	Limpieza de ligadura
RSB	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Limpieza de ligadura

Tabla 11 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (n.º de referencia 20031120)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
UPxx	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele los tubos de cebador de índice correspondientes a temperatura ambiente.	PCR de índices

Tabla 12 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (n.º de referencia 20031126)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
CPxx	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele los tubos de cebador de índice correspondientes a temperatura ambiente.	PCR de índices

Reparación de extremos y adición de cola de A

Este proceso repara los protuberantes resultantes de la fragmentación en extremos con una cola de A protuberante mediante una mezcla maestra de End Repair A-Tailing (ERA1).

La actividad de la exonucleasa 3' a 5' de esta mezcla elimina los extremos 3' protuberantes y la actividad de la polimerasa 5' a 3' rellena los extremos 5' protuberantes. Se añade una cola de A a los extremos 3' durante esta reacción para impedir que se ligen entre sí durante la reacción de ligadura de adaptadores.

Preparación

1. Precaliente dos estaciones de incubación de micromuestras con insertos de termobloque MIDI de la siguiente manera.
 - Precaliente una estación de incubación de micromuestras a 30 °C.
 - Precaliente una estación de incubación de micromuestras a 72 °C.
2. Prepare los siguientes reactivos.
 - ERA1-A: Centrifugue brevemente y, a continuación, pipetee para mezclar. Manténgalo en frío.
 - ERA1-B: Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente. Inspeccione en busca de precipitados. Si los hay, caliente el tubo a 37 °C y, a continuación, pipetee para mezclar hasta que los precipitados se disuelvan.
3. Prepare la mezcla maestra de ERA1 en un tubo de microcentrífuga.

Tabla 13 Mezcla maestra de ERA1*

Componente de la mezcla maestra	4 genotecas	8 genotecas	16 genotecas	24 genotecas
ERA1-B	35 µl	69 µl	138 µl	207 µl
ERA1-A	13,5 µl	27 µl	54 µl	81 µl

* En esta tabla se incluye el excedente de volumen. Consulte [Manipulación de los reactivos, en la página 31](#) para obtener información sobre los cálculos.

4. Pipetee lentamente 10 veces para garantizar la homogeneidad y, a continuación, centrifugue brevemente. Mantenga la mezcla maestra ERA1 en frío.

5. Para preparar la placa, seleccione una de las siguientes opciones:
- Si las muestras están en una placa MIDI, prepárela de la siguiente manera.
 - a. Vuelva a etiquetar la placa MIDI como LP2 (preparación de genotecas 2).
 - b. Si algunas muestras se encuentran en placas MIDI separadas, mueva todas las muestras a pocillos separados de la misma placa MIDI de acuerdo con el diseño de la placa.
 - Si la placa está congelada, prepárela de la siguiente manera.
 - a. Descongele la placa de PCR de LP a temperatura ambiente.
 - b. Centrifugue la placa a $280 \times g$ durante 1 minuto.
 - c. Pipetee 10 veces para mezclar.
 - d. Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como LP2 (preparación de genotecas 2).
 - e. Transfiera los 50 μ l de cada muestra de la placa de PCR de LP al pocillo correspondiente de la placa MIDI de LP2.
 - f. Deseche la placa de PCR de LP.

Procedimiento

1. Añada 10 μ l de mezcla maestra de ERA1 a cada pocillo de muestra en la placa MIDI de LP2.
2. Deseche la mezcla maestra de ERA1 restante.
3. Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de LP2.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
4. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
5. Incube en la estación de incubación de micromuestras precalentada a 30 °C durante 30 minutos.
6. Realice una transferencia a una segunda estación de incubación de micromuestras precalentada.
7. Incube a 72 °C durante 20 minutos.
8. Mantenga la placa MIDI de LP2 en frío durante 5 minutos.

Ligación de adaptadores

Este proceso liga los adaptadores a los extremos de los fragmentos de ADNg.

Preparación



PRECAUCIÓN

Utilice únicamente adaptadores UMI. Se proporcionan adaptadores SUA1, pero no son necesarios para el ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

1. Prepare los siguientes reactivos.
 - ALB1: Agite en vórtex durante 10 segundos como mínimo para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.

- LIG3: Centrifugue brevemente y, a continuación, pipetee para mezclar. Manténgalo en frío.
- UMI: Agite en vórtex durante 10 segundos como mínimo para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
- STL: Apártelo para usarlo en el procedimiento.

Procedimiento

1. Retire la placa MIDI de LP2 del hielo o equivalente.
2. Añada 60 µl de ALB1 a cada pocillo de muestra de la placa MIDI de LP2. ALB1 es una solución viscosa. Pipetee lentamente para minimizar la formación de burbujas.
3. Añada 5 µl de LIG3 a cada pocillo de muestra.
4. Añada 10 µl de UMI (tapa blanca) a cada pocillo de muestra.
5. Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de LP2. Selle los bordes y los pocillos completamente.
6. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
7. Incube a temperatura ambiente durante 30 minutos.
8. Agite STL en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
9. Añada 5 µl de STL a cada pocillo de muestra de la placa MIDI de LP2.
10. Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de LP2. Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
11. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.

Limpieza de ligadura

En este proceso se usan SPB para purificar los fragmentos de ADN_g ligados por adaptadores y se eliminan los productos no deseados. Las bolas se lavan dos veces con nuevo etanol al 80 %. Las muestras ligadas por adaptadores se eluyen con RSB.

Preparación

1. Prepare los siguientes reactivos.
 - SPB: Asegúrese de que las bolas estén a temperatura ambiente durante 30 minutos.
 - RSB: Apártelo para usarlo en el procedimiento.
2. Prepare nuevo EtOH al 80 % en un tubo cónico de 15 ml o 50 ml.

Tabla 14 Prepare nuevo etanol al 80 %

Reactivo	4 genotecas	8 genotecas	16 genotecas	24 genotecas
EtOH al 100 %, puro	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml

Reactivo	4 genotecas	8 genotecas	16 genotecas	24 genotecas
Agua sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Agite en vórtex nuevo EtOH al 80 % para mezclar.
4. Configure el imán.

Procedimiento

Unión

1. Agite en vórtex las SPB durante 1 minuto para volver a suspender las bolas.
2. Justo después, añada 112 µl de SPB a cada pocillo de muestra en la placa MIDI de LP2.
Si se usa una cubeta para dispensar SPB, incluya un factor de excedente de 1,15 al alicuotar suficiente material por muestra. Deseche el material restante después de añadir las SPB a cada pocillo de la muestra.
3. Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de LP2.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
4. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
5. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
6. Coloque la placa MIDI de LP2 en el soporte magnético durante 10 minutos.
7. Sin alterar la microesfera de bolas, use una pipeta ajustada a 200 µl para retirar y desechar todo el sobrenadante de cada pocillo de muestra.

Lavado

1. Lave las bolas de la siguiente manera:
 - a. Mantenga la placa MIDI de LP2 en el soporte magnético y añada 200 µl de nuevo EtOH al 80 % a cada pocillo de muestra.
 - b. Espere 30 segundos.
 - c. Sin alterar la microesfera de bolas, use una pipeta ajustada a 200 µl para retirar y desechar todo el sobrenadante de cada pocillo de muestra.
2. Lave las bolas una **segunda** vez.
3. Use una pipeta con puntas finas para retirar y desechar el EtOH residual de cada pocillo.
4. Deseche el EtOH al 80 % sin usar.

Elución

1. Retire la placa MIDI de LP2 del soporte magnético.
2. Invierta el RSB o agítelo en vórtex para mezclar.
3. Añada 27,5 µl de RSB a cada pocillo de muestra.

4. Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de LP2.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
5. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
6. Incube a temperatura ambiente durante 2 minutos.
7. Coloque la placa MIDI de LP2 en un soporte magnético durante 2 minutos.
8. Etiquete una nueva placa de PCR de 96 pocillos como LS (muestras de genotecas).
9. Transfiera 25 µl de cada eluido de la placa MIDI de LP2 al pocillo correspondiente de la placa de PCR de LS.
10. Deseche la placa MIDI de LP2 vacía.

PCR de índices

En este paso, los fragmentos de genotecas se amplifican con cebadores que añaden secuencias de índices para el multiplexado de muestras. El producto resultante contiene la genoteca completa de fragmentos de ADN flanqueados por los adaptadores necesarios para la generación de grupos.

Preparación

1. Prepare los siguientes reactivos.
 - EPM: manténgalo en frío.
 - UPxx: Agite en vórtex para mezclar y centrifugue brevemente.
 - CPxx: Agite en vórtex para mezclar y centrifugue brevemente.
2. Asegúrese de que los índices para cada muestra coincidan con el experimento planeado en TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) analysis module durante la configuración del experimento. Asegúrese de seguir las instrucciones relativas a la selección de índices en [Número de genotecas y selección de índices, en la página 33](#).



PRECAUCIÓN

Las discrepancias entre las muestras y los cebadores de indexación generan informes con resultados incorrectos debido a que no se identifican las muestras positivas.

Procedimiento

1. Añada 5 µl del cebador de índice adecuado (UPxx o CPxx) en el pocillo de muestra correspondiente de la placa de PCR de LS de acuerdo con los índices seleccionados.



PRECAUCIÓN

Manipule y abra solamente un tubo de cebador de índice a la vez. Tape cada tubo de índice con una tapa nueva inmediatamente después de su uso. No combine cebadores de índice entre sí.

2. Agite en vórtex la EPM para mezclar durante 5 segundos y, a continuación, centrifugue brevemente.
3. Añada 20 µl de EPM a cada pocillo de muestra.

4. Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de LS.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
5. Agite a 1200 rpm durante 1 minuto.
6. Vuelva a almacenar los reactivos de preamplificación.

**PRECAUCIÓN**

Ejecute todos los pasos sucesivos en una zona de posamplificación para evitar el arrastre del producto de amplificación.

7. Centrifugue la placa de PCR de LS a 280 × g durante 1 minuto.
8. Coloque la placa en el ciclador térmico de posamplificación preprogramado y ejecute el programa I-PCR.
Consulte [Programación de los termocicladores, en la página 39](#).
Si continúa con [Configuración de la primera hibridación, en la página 49](#), siga las instrucciones de descongelación para los reactivos de Preparación de los pasos del protocolo.
9. Una vez finalizado el programa I-PCR, centrifugue la placa de PCR de LS a 280 × g durante 1 minuto.
10. Vuelva a etiquetar la placa como ALS (muestras de genotecas amplificadas).

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si debe detener el procedimiento, selle la placa de PCR de ALS a entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de 30 días.

Preparación del protocolo

Esta preparación es necesaria para realizar los pasos del protocolo previos a la hibridación nocturna.

1. Asegúrese de ajustar los programas del termociclador de posamplificación. Consulte [Programación de los termocicladores, en la página 39](#).
2. Retire los tubos de reactivos de la caja y siga las instrucciones de descongelación.

Tabla 15 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n.º de referencia 20031123) además de la TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (n.º de referencia 20140116)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
TCB1	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Configuración de la primera hibridación

Tabla 16 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n.º de referencia 20031121) además de la TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (n.º de referencia 20140115)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
TCA1	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Configuración de la primera hibridación

Tabla 17 TruSight Oncology Comp Content Set Box (n.º de referencia 20031122)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
OPD2 (tapa blanca)	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Configuración de la primera hibridación

Tabla 18 TruSight Oncology Comp HRD Content Set Box (n.º de referencia 20140117)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
OPD3 (tapa azul)	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Configuración de la primera hibridación

Configuración de la primera hibridación

Durante este proceso, dos grupos de oligonucleótidos (OPD2 y OPD3) se hibridan en genotecas de ADN_g preparadas en [PCR de índices, en la página 47](#). El enriquecimiento de las regiones de interés requiere dos pasos de hibridación. En la primera hibridación, los oligonucleótidos se hibridan en las genotecas de ADN_g durante la noche (de 8 horas a 24 horas).

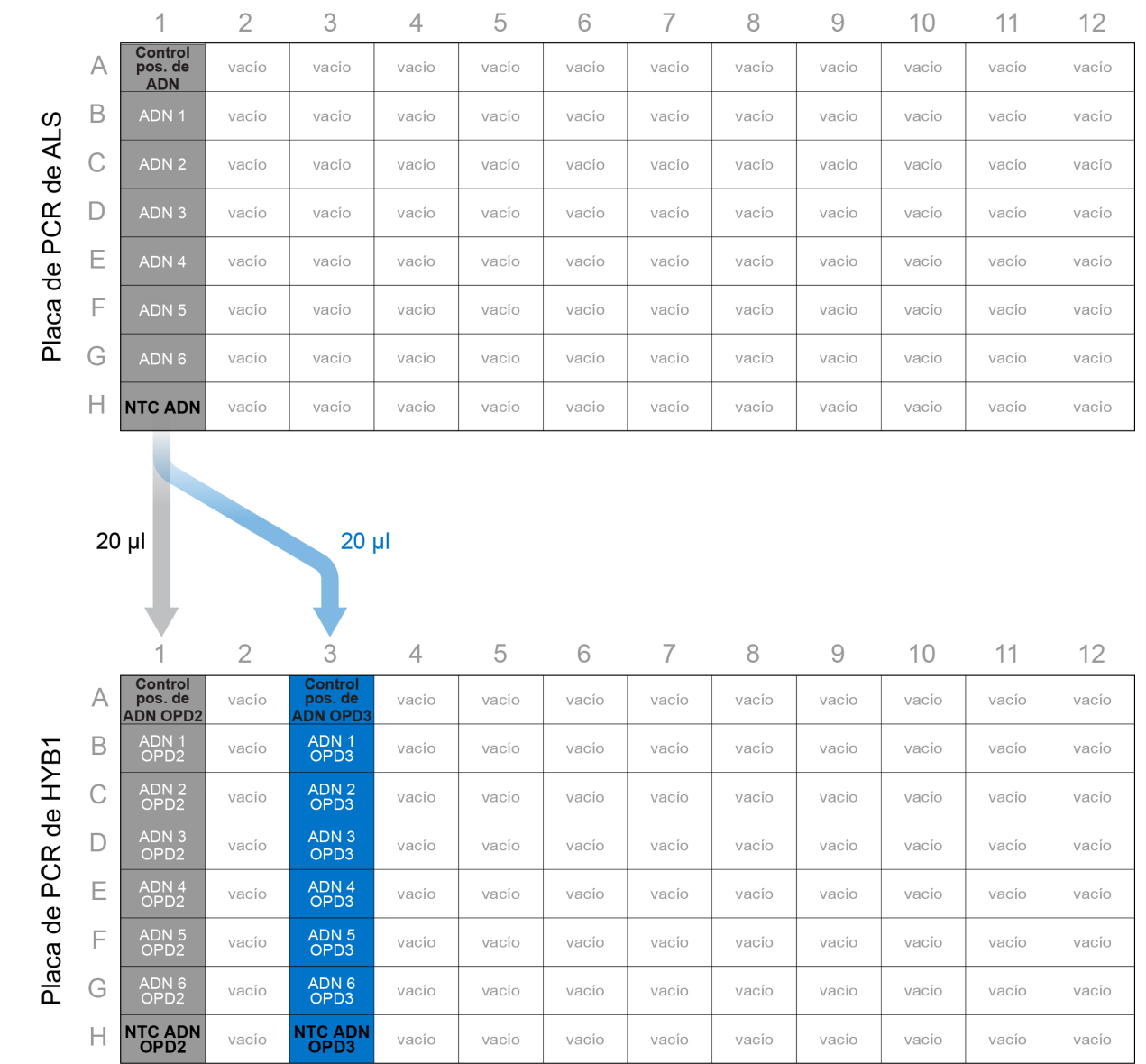
Preparación

1. Prepare los siguientes reactivos.
 - TCB1: Caliente el tubo a 37 °C durante 5 minutos. Agite en vórtex durante 10 segundos para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - TCA1: Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - OPD2: Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - OPD3: Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
2. Si la placa de PCR de ALS estaba almacenada, descongélela a temperatura ambiente y, a continuación, centrifugue a 280 × g durante 1 minuto. Pipetee para mezclar.
3. Etiquete una nueva placa de PCR de 96 pocillos como HYB1 (Hibridación 1).

Procedimiento

1. Transfiera 20 µl de cada genoteca de ADNg de la placa de PCR de ALS al pocillo correspondiente en la placa de PCR de HYB1 para el enriquecimiento con sondas OPD2. Incluya controles positivos y NTC para el enriquecimiento con sondas OPD2.
2. Transfiera una genoteca adicional de ADNg de 20 µl de la placa de PCR de ALS a un segundo pocillo de la placa de PCR de HYB1 para el enriquecimiento con sondas OPD3, como se muestra en la [Figura 3](#). Incluya controles positivos y NTC para el enriquecimiento con sondas OPD3.

Figura 3 Primer diseño de placa de ejemplo de hibridación de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)



3. Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de ALS y apártela.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.

4. Inspeccione TCB1 en busca de precipitados. Si los hay, caliente nuevamente el tubo y agite en vórtex el tubo hasta que se disuelvan los cristales.
5. Añada 15 µl de TCB1 a cada pocillo de la genoteca en la placa de PCR de HYB1.
6. Añada 10 µl de TCA1 a cada pocillo de la genoteca en la placa de PCR de HYB1.
7. Añada las sondas.
No combine entre sí tipos diferentes de sondas. Añada solo un conjunto de sondas por pocillo.
 - **[Pocillos de genoteca de ADN]:** Añada 5 µl de OPD2 (tapa blanca) a cada genoteca obtenida del ADN.
 - **[Pocillos de genoteca de ADN HRD]:** Añada 5 µl de OPD3 (tapa azul) a cada genoteca obtenida del ADN para el enriquecimiento de HRD.
8. Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR HYB1.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
9. Agite a 1200 rpm durante 2 minutos.
10. Coloque la placa en el termociclador y ejecute el programa HYB1.
Consulte [Programación de los termocicladores, en la página 39](#).
11. Hibride a 57 °C durante un mínimo de 8 horas y hasta un máximo de 24 horas.
12. Vuelva a almacenar los reactivos de hibridación.

Preparación del protocolo

Esta preparación es necesaria para poder seguir los pasos del protocolo que conducen al siguiente punto de detención de seguridad.

Al inicio del día 2, retire el tubo de reactivos de la caja y siga las instrucciones de descongelación.

Tabla 19 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n.º de referencia 20031123) además de la TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (n.º de referencia 20140116)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
SMB (etiqueta azul oscuro)	Entre 2 °C y 8 °C	Déjelo a temperatura ambiente durante 30 minutos.	1.ª captura de las regiones de interés 2.ª captura de las regiones de interés
ET2	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	1.ª captura de las regiones de interés 2.ª captura de las regiones de interés

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
HP3	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	1.ª captura de las regiones de interés 2.ª captura de las regiones de interés Normalización de las genotecas
TCB1	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Configuración de la segunda hibridación
RSB	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	2.ª captura de las regiones de interés Limpieza de genotecas enriquecidas amplificadas

Tabla 20 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n.º de referencia 20031121) además de la TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (n.º de referencia 20140115)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
EE2	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	1.ª captura de las regiones de interés 2.ª captura de las regiones de interés Normalización de las genotecas
EEW	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	1.ª captura de las regiones de interés
TCA1	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Configuración de la segunda hibridación

Tabla 21 TruSight Oncology Comp Content Set Box (n.º de referencia 20031122)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
OPD2 (tapa blanca)	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Configuración de la segunda hibridación

Tabla 22 TruSight Oncology Comp HRD Content Box (n.º de referencia 20140117)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
OPD3 (tapa azul)	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Configuración de la segunda hibridación

1.ª captura de las regiones de interés

En este paso se usan las SMB para capturar sondas hibridadas en las regiones objetivo de interés. Las bolas se lavan tres veces con EEW. Las genotecas enriquecidas se eluyen con una mezcla de elución de EE2 + HP3 nueva y se neutralizan con ET2.

Preparación

1. Precaliente una estación de incubación de micromuestras con un inserto de termobloque MIDI a 57 °C.
2. Prepare los siguientes reactivos.
 - EEW: Agite en vórtex para mezclar durante 1 minuto.
 - EE2: Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - HP3: Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - SMB: Asegúrese de que las bolas estén a temperatura ambiente durante 30 minutos. Asegúrese de usar **SMB**, no SPB, para este procedimiento.
 - ET2: Apártelo para usarlo en el procedimiento.
3. Prepare una mezcla de elución de EE2 + HP3 nueva en un tubo de microcentrífuga.

Tabla 23 Mezcla de elución de EE2 + HP3 para 1.ª captura de las regiones de interés*

Componente de la mezcla de elución	8 genotecas	16 genotecas	24 genotecas	48 genotecas
EE2	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* En esta tabla se incluye el excedente de volumen. Consulte [Manipulación de los reactivos, en la página 31](#) para obtener información sobre los cálculos.

4. Agite en vórtex la mezcla de elución de EE2 + HP3 y, a continuación, centrifugue brevemente. Apártela para el paso [Elución, en la página 55](#).
5. Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como CAP1 (Captura 1).
6. Configure el imán.

Procedimiento

Unión

1. Retire la placa de PCR de HYB1 del termociclador.
2. Centrifugue la placa de PCR de HYB1 a 280 × g durante 1 minuto.
3. Agite en vórtex las SMB durante 1 minuto para volver a suspender las bolas.
Si hay precipitado o microesfera de bolas, asegúrese de alcanzar la temperatura ambiente, pipetee arriba y abajo para liberar la microesfera y, a continuación, agite en vórtex para volver a suspenderla.

4. Justo después, añada 150 µl de SMB a cada pocillo de la genoteca para la placa MIDI de CAP1.
Si se usa una cubeta para dispensar SPB, incluya un factor de excedente de 1,05 al alicuotar para permitir suficiente material por muestra.
5. Después de añadir las SMB a cada pocillo de la muestra, deseche el material restante.
6. Ajuste la pipeta a 50 µl y transfiera el volumen íntegro de cada genoteca de la placa de HYB1 PCR al pocillo correspondiente en la placa MIDI CAP1.
7. Deseche la placa de PCR de HYB1 vacía.
8. Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de CAP1.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
9. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
10. Incube en la estación de incubación de micromuestras precalentadas a 57 °C durante 25 minutos.
11. Coloque la placa MIDI de CAP1 en un soporte magnético durante 2 minutos.
12. Mantenga la placa en el soporte magnético. Sin alterar la microesfera de bolas, use una pipeta ajustada a 200 µl para retirar y desechar todo el sobrenadante de cada pocillo.



PRECAUCIÓN

Inmediatamente después, continúe con el paso siguiente ([Lavado, en la página 55](#)). No deje que la microesfera de bolas se asiente durante un periodo de tiempo prolongado sin que haya líquido presente.

Lavado

1. Lave las bolas de la siguiente manera:
 - a. Retire la placa MIDI de CAP1 del soporte magnético.
 - b. Añada 200 µl de EEW a cada pocillo.
 - c. Use una pipeta ajustada a 150 µl y pipetee un mínimo de 10 veces para mezclar. Asegúrese de que todas las bolas se hayan resuspendido.

Asegúrese de que no haya microesferas de bolas presentes; para ello, aspire con cuidado toda la solución de bolas del pocillo en la punta. Inspeccione de forma visual la parte inferior de cada pocillo. Si hay una microesfera de bolas presente, incline la punta de la pipeta hacia la microesfera durante los pasos de lavado para liberarlo. Asegúrese de que la microesfera de bolas esté completamente inmersa dentro de la solución. La solución debe ser de color marrón oscuro y presentar una consistencia homogénea.
 - d. Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de CAP1.

Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
 - e. Agite a 1800 rpm durante 4 minutos.
 - f. Incube en una estación de incubación de micromuestras a 57 °C durante 5 minutos.
 - g. Coloque la placa MIDI de CAP1 en un soporte magnético durante 2 minutos.
 - h. Mantenga la placa en el soporte magnético. Sin alterar la microesfera de bolas, use una pipeta ajustada a 200 µl para retirar y desechar todo el sobrenadante de cada pocillo.
2. Lave las bolas una **segunda** vez.
3. Lave las bolas una **tercera** vez.
4. Use una pipeta con puntas finas para retirar y desechar el EEW residual de cada pocillo.

Elución

1. Retire la placa MIDI de CAP1 del soporte magnético.
2. Agite en vórtex la mezcla de elución de EE2 + HP3 nueva y, a continuación, centrifugue brevemente.
3. Con cuidado, añada 17 µl de mezcla de elución de EE2 + HP3 a cada pocillo de la genoteca en la placa MIDI de CAP1.
4. Deseche la mezcla de elución de EE2 + HP3 restante.
5. Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de CAP1.

Selle los bordes y los pocillos completamente.
6. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
7. Coloque la placa en un soporte magnético durante 2 minutos.
8. Etiquete una nueva placa de PCR de 96 pocillos como ELU1 (Elución 1).
9. Agite ET2 en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
10. Añada 5 µl de ET2 a cada pocillo de la genoteca correspondiente en la nueva placa de PCR de ELU1.

11. Transfiera con cuidado 15 µl de eluido de cada pocillo de la genoteca de la placa MIDI de CAP1 al pocillo correspondiente en la placa de PCR de ELU1.
12. Deseche la placa MIDI de CAP1 vacía.
13. Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de ELU1.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
14. Agite a 1200 rpm durante 2 minutos.
15. Vuelva a almacenar el EEW.

Configuración de la segunda hibridación

En este paso se unen regiones de interés de las genotecas enriquecidas de ADNg con sondas de captura una segunda vez. La segunda hibridación garantiza una alta especificidad de las regiones capturadas. Para garantizar un enriquecimiento óptimo de las genotecas, realice el segundo paso de hibridación a 57 °C durante un periodo mínimo de 1,5 horas y hasta un máximo de 4 horas.

Preparación

1. Prepare los siguientes reactivos.
 - TCB1: Caliente el tubo a 37 °C durante 5 minutos. Agite en vórtex durante 10 segundos para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - TCA1: Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - OPD2: Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - OPD3: Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.

Procedimiento

1. Inspeccione si hay precipitados en el TCB1. Si los hay, caliente nuevamente el tubo y agite en vórtex hasta que se disuelvan los cristales.
2. Añada 15 µl de TCB1 a cada pocillo de la genoteca en la placa de PCR de ELU1.
3. Añada 10 µl de TCA1 a cada pocillo de la genoteca.
4. Añada la misma sonda utilizada durante la primera hibridación a cada pocillo. Añada solo un conjunto de sondas por pocillo.
No combine entre sí tipos diferentes de sondas.
 - **[Pocillos de genoteca de ADN]:** Añada 5 µl de OPD2 (tapa blanca) a cada genoteca obtenida del ADN.
 - **[Pocillos de genoteca de ADN HRD]:** 5 µl de OPD3 (tapa azul) a cada genoteca obtenida del ADN para el enriquecimiento de HRD.
5. Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de ELU1.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
6. Agite a 1200 rpm durante 2 minutos.

7. Coloque la placa en un termociclador y ejecute el programa HYB2.
Consulte [Programación de los termocicladores, en la página 39](#).
8. Hibride a 57 °C para un mínimo de 1,5 horas y hasta un máximo de 4 horas.
9. Vuelva a almacenar los reactivos de hibridación.

2.ª captura de las regiones de interés

En este paso se usan las SMB para capturar sondas hibridadas en las regiones objetivo de interés. Las bolas se lavan una vez en RSB. Las genotecas enriquecidas se eluyen con una mezcla de elución de EE2 + HP3 nueva y se neutralizan con ET2.

Preparación

1. Precaliente una estación de incubación de micromuestras con inserto de termobloque MIDI a 57 °C.
2. Prepare los siguientes reactivos.
 - EE2: Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - HP3: Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - SMB: Asegúrese de que las bolas estén a temperatura ambiente durante 30 minutos.
Asegúrese de usar **SMB**, no SPB, para este procedimiento.
 - RSB: Apártelo para usarlo en el procedimiento.
 - ET2: Apártelo para usarlo en el procedimiento.
3. Prepare una mezcla de elución de EE2 + HP3 nueva en un tubo de microcentrífuga.

Tabla 24 Mezcla de elución de EE2 + HP3 para 2.ª captura de las regiones de interés*

Componente de la mezcla de elución	8 genotecas	16 genotecas	24 genotecas	48 genotecas
EE2	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* En esta tabla se incluye el excedente de volumen. Consulte [Manipulación de los reactivos, en la página 31](#) para obtener información sobre los cálculos.

4. Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente. Apártela para el paso [Elución, en la página 59](#).
5. Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como CAP2 (Captura 2).
6. Configure el imán.

Procedimiento

Unión

1. Retire la placa de PCR de ELU1 del termociclador.

2. Centrifugue la placa de PCR de ELU1 a 280 × g durante 1 minuto.
3. Agite en vórtex las SMB durante 1 minuto para volver a suspender las bolas.
4. Justo después, añada 150 µl de SMB a cada pocillo de la genoteca para la placa MIDI de CAP2.
Si se usa una cubeta para dispensar SPB, incluya un factor de excedente de 1,05 al alicuotar para permitir suficiente material por muestra.
5. Después de añadir las SMB a cada pocillo de la muestra, deseche el material restante.
6. Ajuste la pipeta a 50 µl y transfiera el volumen íntegro de cada genoteca de la placa de PCR de ELU1 al pocillo correspondiente de la placa MIDI de CAP2.
7. Deseche la placa de PCR de ELU1 vacía.
8. Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de CAP2.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
9. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
10. Incube en una estación de incubación de micromuestras a 57 °C durante 25 minutos.
Si continúa con [Amplificación de las genotecas enriquecidas, en la página 60](#), siga las instrucciones de descongelación para reactivos de la sección [Preparación del protocolo](#).
11. Coloque la placa en un soporte magnético durante 2 minutos.
12. Mantenga la placa MIDI de CAP2 en el soporte magnético. Sin alterar la microesfera de bolas, use una pipeta ajustada a 200 µl para retirar y desechar todo el sobrenadante de cada pocillo.



PRECAUCIÓN

Inmediatamente después, continúe con el paso siguiente ([Lavado, en la página 58](#)). No deje que la microesfera de bolas se asiente durante un periodo de tiempo prolongado sin que haya líquido presente.

Lavado

1. Retire la placa MIDI de CAP2 del soporte magnético.
2. Invierta el RSB o agítelo en vórtex para mezclar.
3. Añada 200 µl de RSB a cada pocillo.
4. Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de CAP2.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
5. Agite a 1800 rpm durante 4 minutos.
6. Coloque la placa en el soporte magnético durante 2 minutos.
7. Mantenga la placa en el soporte magnético. Sin alterar la microesfera de bolas, use una pipeta ajustada a 200 µl para retirar y desechar todo el sobrenadante de cada pocillo.
8. Use una pipeta con puntas finas para retirar los restos de RSB de cada pocillo.

Elución

1. Retire la placa MIDI de CAP2 del soporte magnético.
2. Agite en vórtex la mezcla de elución de EE2 + HP3 nueva y, a continuación, centrifugue brevemente.
3. Añada 22 µl de mezcla de elución de EE2 + HP3 a cada pocillo de la genoteca en la placa MIDI de CAP2.
4. Deseche la mezcla de elución de EE2 + HP3 restante.
5. Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de CAP2.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
6. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
7. Coloque la placa en un soporte magnético durante 2 minutos.
8. Etiquete una nueva placa de PCR de 96 pocillos como ELU2 (Elución 2).
9. Agite ET2 en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
10. Añada 5 µl de ET2 en cada pocillo de la genoteca correspondiente en la nueva placa de PCR de ELU2.
11. Transfiera con cuidado 20 µl de eluido de cada pocillo de la genoteca de la placa MIDI de CAP2 al pocillo correspondiente en la placa de PCR de ELU2.
12. Deseche la placa MIDI de CAP2 vacía.
13. Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de ELU2.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
14. Agite a 1200 rpm durante 2 minutos.
15. Vuelva a almacenar las SMB, la EE2, el HP3, el RSB y el ET2.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si debe detener el procedimiento, centrifugue la placa de PCR de ELU2 a 280 × g durante 1 minuto y almacénela a entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de 7 días.

Preparación del protocolo

Esta preparación es necesaria para poder seguir los pasos del protocolo que conducen al siguiente punto de detención de seguridad.

1. Prepare una caja de hielo o equivalente.
2. Retire los tubos de reactivos de la caja y siga las instrucciones de descongelación.

Tabla 25 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n.º de referencia 20031121) además de la TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (n.º de referencia 20140115)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
PPC3	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Amplificación de las genotecas enriquecidas

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
EPM	Entre -25 °C y -15 °C	Manténgalo en frío.	Amplificación de las genotecas enriquecidas

Tabla 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n.º de referencia 20031123) además de la TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (n.º de referencia 20140116)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
SPB (etiqueta verde claro)	Entre 2 °C y 8 °C	Déjelo a temperatura ambiente durante 30 minutos.	Limpieza de genotecas enriquecidas amplificadas
RSB	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Limpieza de genotecas enriquecidas amplificadas Preparación para la secuenciación

Amplificación de las genotecas enriquecidas

En este paso se usan cebadores para amplificar las genotecas enriquecidas.

Preparación

1. Si la placa de ELU2 estaba almacenada, descongéla a temperatura ambiente y, a continuación, centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.

Procedimiento

1. Agite en vórtex la PPC3 para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
2. Añada 5 µl de PPC3 en cada pocillo de genoteca de la placa de PCR de ELU2.
3. Agite en vórtex la EPM para mezclar durante 5 segundos y, a continuación, centrifugue brevemente.
4. Añada 20 µl de EPM a cada pocillo de genoteca.
5. Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de ELU2.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
6. Agite a 1200 rpm durante 2 minutos.
7. Coloque la placa en un termociclador y ejecute el programa EL-PCR.
Consulte [Programación de los termocicladores, en la página 39](#).
Si continúa con [Normalización de las genotecas, en la página 63](#), siga las instrucciones de descongelación de la sección [Preparación del protocolo](#).
8. Vuelva a almacenar la PPC3 y la EPM.

Limpieza de genotecas enriquecidas amplificadas

En este paso se usan SPB para purificar las genotecas enriquecidas de componentes de reacción no deseados. Las bolas se lavan dos veces con nuevo etanol al 80 %. Las genotecas se eluyen con RSB.

Preparación

1. Prepare los siguientes reactivos.
 - SPB: Asegúrese de que las bolas estén a temperatura ambiente durante 30 minutos. Asegúrese de usar *SPB* para este procedimiento, no *SMB*.
 - RSB: Apártelo para usarlo en el procedimiento.
2. Prepare nuevo etanol al 80 % en un tubo cónico de 15 ml o 50 ml.

Tabla 27 Prepare nuevo etanol al 80 %

Reactivo	8 genotecas	16 genotecas	24 genotecas	48 genotecas
EtOH al 100 %, puro	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Agua sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Agite en vórtex nuevo EtOH al 80 % para mezclar.
4. Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como BIND2 (Limpieza de placa de unión).
5. Configure el imán.

Procedimiento

Unión

1. Retire la placa de PCR de ELU2 del termociclador.
2. Centrifugue la placa de PCR de ELU2 a 280 × g durante 1 minuto.
3. Agite en vórtex las SPB durante 1 minuto para volver a suspender las bolas.
4. Justo después, añada 110 µl de SPB a cada pocillo de la genoteca para la placa MIDI de BIND2.
Si se usa una cubeta para dispensar SPB, incluya un factor de excedente de 1,15 al alicuotar suficiente material por muestra. Deseche el material restante después de añadir las SPB a cada pocillo de la muestra.
5. Transfiera 50 µl de cada genoteca de la placa de PCR de ELU2 al pocillo correspondiente de la placa MIDI de BIND2.
6. Deseche la placa de PCR de ELU2 vacía.
7. Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de BIND2.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
8. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
9. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.

10. Coloque la placa MIDI de BIND2 en un soporte magnético durante 5 minutos.
11. Mantenga la placa en el soporte magnético. Sin alterar la microesfera de bolas, use una pipeta ajustada a 200 µl para retirar y desechar todo el sobrenadante de cada pocillo.

Lavado

1. Lave las bolas de la siguiente manera:
 - a. Mantenga la placa MIDI de BIND2 en el soporte magnético y añada 200 µl de nuevo EtOH al 80 % a cada pocillo.
 - b. Espere 30 segundos.
 - c. Sin alterar la microesfera de bolas, use una pipeta ajustada a 200 µl para retirar y desechar todo el sobrenadante de cada pocillo.
2. Lave las bolas una **segunda** vez.
3. Use una pipeta con puntas finas para retirar y desechar el EtOH residual de cada pocillo.
4. Deseche el EtOH al 80 % sin usar.

Elución

1. Retire la placa MIDI de BIND2 del soporte magnético.
2. Invierta el RSB o agítelo en vórtex para mezclarlo.
3. Añada 32 µl de RSB a cada pocillo de la genoteca.
4. Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de BIND2.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
5. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
6. Incube a temperatura ambiente durante 2 minutos.
7. Coloque la placa en un soporte magnético durante 2 minutos.
8. Etiquete una nueva placa de PCR de 96 pocillos como PL (genotecas purificadas).
9. Transfiera 30 µl de cada eluido de la placa MIDI de BIND2 al pocillo correspondiente de la placa de PCR de PL.
10. Deseche la placa MIDI de BIND2 vacía.
11. Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de PL.
12. Vuelva a almacenar el SPB y el RSB.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si debe detener el procedimiento, centrifugue la placa de PCR de PL a 280 × g durante 1 minuto y almacénela entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de 30 días.

Preparación del protocolo

Esta preparación es necesaria para poder seguir los pasos del protocolo que conducen al siguiente punto de detención de seguridad.

1. Retire los tubos de reactivos de la caja y siga las instrucciones de descongelación.

Tabla 28 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n.º de referencia 20031121) además de la TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (n.º de referencia 20140115)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
LNA1	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Normalización de las genotecas
EE2	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Normalización de las genotecas

Tabla 29 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n.º de referencia 20031123) además de la TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (n.º de referencia 20140116)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
LNB1	Entre 2 °C y 8 °C	Déjelo a temperatura ambiente durante 30 minutos.	Normalización de las genotecas
HP3	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Normalización de las genotecas Preparación para la secuenciación
LNW1	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Normalización de las genotecas
LNS1	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Normalización de las genotecas

2. Si ese mismo día va a continuar con [Preparación para la secuenciación, en la página 67](#), siga las instrucciones de descongelación que aparecen en la sección Preparación del protocolo.

Normalización de las genotecas

Este proceso usa LNB1 más aditivos (LNA1) para normalizar la cantidad de cada genoteca para garantizar una representación de genotecas uniforme en las genotecas agrupadas. Las bolas se lavan dos veces con LNW1. Las genotecas se eluyen con una mezcla de elución de EE2 + HP3 nueva y se neutralizan con LNS1.

Preparación

1. Prepare los siguientes reactivos.

- LNB1: Asegúrese de que las bolas estén a temperatura ambiente durante 30 minutos.
 - LNA1: Agite en vórtex para mezclar.
 - EE2: Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - HP3: Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - LNW1: Agite en vórtex para mezclar. Apártelo para usarlo en el procedimiento.
 - LNS1: Agite en vórtex para mezclar. Apártelo para usarlo en el procedimiento.
2. Agite en vórtex las LNB1 durante 1 minuto para volver a suspender las bolas.
Invierta el tubo de LNB1 para asegurarse de que todas las bolas se hayan resuspendido.
 3. Repita la agitación en vórtex por pulsos durante 1 minuto si se observa un sedimento.
 4. Use una pipeta ajustada a 800 µl para pipetear LNB1 hacia arriba y hacia abajo 10 veces para garantizar la resuspensión.
 5. Justo después, prepare una mezcla maestra de LNA1 + LNB1 nueva en un tubo cónico.

**PRECAUCIÓN**

Resuspenda completamente la microesfera de bolas LNB1 en la parte inferior del tubo para evitar que se produzca una densidad de grupos inestable.

Tabla 30 Mezcla maestra de LNA1 + LNB1*

Componente de la mezcla maestra	8 genotecas	16 genotecas	24 genotecas	48 genotecas
LNA1	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* En esta tabla se incluye el excedente de volumen. Consulte [Manipulación de los reactivos, en la página 31](#) para obtener información sobre los cálculos.

6. Agite en vórtex la mezcla maestra de LNA1 + LNB1. Apártela para el paso [Unión, en la página 65](#).
7. Prepare una mezcla de elución de EE2 + HP3 nueva en un tubo de microcentrífuga.

Tabla 31 Mezcla de elución de EE2 + HP3 para normalizar genotecas*

Componente de la mezcla de elución	8 genotecas	16 genotecas	24 genotecas	48 genotecas
EE2	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* En esta tabla se incluye el excedente de volumen. Consulte [Manipulación de los reactivos, en la página 31](#) para obtener información sobre los cálculos.

8. Agite en vórtex la mezcla de elución nueva y, a continuación, centrifugue brevemente. Apártela para el paso [Elución, en la página 65](#).
9. Si la placa de PCR de PL estaba almacenada, descongéla a temperatura ambiente y centrifugue a 280 × g durante 1 minuto. Pipetee para mezclar.

10. Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como BBN (normalización basada en bolas).
11. Configure el imán.

Procedimiento

Unión

1. Agite en vórtex la mezcla maestra de LNA1 + LNB1.
2. Justo después, añada 45 µl de mezcla maestra de LNA1 + LNB1 a cada pocillo de la genoteca de la placa MIDI de BBN.
3. Deseche la mezcla maestra de LNA1 + LNB1 restante.
4. Añada 20 µl de cada genoteca de la placa de PCR de PL en el pocillo correspondiente de la placa MIDI de BBN.
5. Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de BBN.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
6. Agite a 1800 rpm durante 30 minutos.
7. Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de PL y vuelva a almacenarla.
8. Coloque la placa MIDI de BBN en un soporte magnético durante 2 minutos.
9. Mantenga la placa en el soporte magnético. Sin alterar la microesfera de bolas, use una pipeta ajustada a 200 µl para retirar y desechar todo el sobrenadante de cada pocillo.

Lavado

1. Lave las bolas de la siguiente manera:
 - a. Retire la placa MIDI de BBN del soporte magnético.
 - b. Añada 45 µl de LNW1 a cada pocillo de la genoteca.
 - c. Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de BBN.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
 - d. Agite a 1800 rpm durante 5 minutos.
 - e. Coloque la placa MIDI de BBN en un soporte magnético durante 2 minutos.
 - f. Mantenga la placa en el soporte magnético. Sin alterar la microesfera de bolas, use una pipeta ajustada a 200 µl para retirar y desechar todo el sobrenadante de cada pocillo.
2. Lave las bolas una *segunda* vez.
3. Use una pipeta con puntas finas para eliminar el sobrenadante residual de cada pocillo.

Elución

1. Retire la placa MIDI de BBN del soporte magnético.
2. Agite en vórtex la mezcla de elución de EE2 + HP3 nueva y, a continuación, centrifugue brevemente.
3. Añada 32 µl de solución de EE2 + HP3 a cada pocillo de la genoteca de la placa MIDI de BBN.

4. Deseche la mezcla de elución restante.
5. Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de BBN.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
6. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
7. Coloque la placa en un soporte magnético durante 2 minutos.
8. Etiquete una nueva placa de PCR de 96 pocillos como NL (genotecas normalizadas).
9. Transfiera con cuidado 30 µl de eluido de cada pocillo de la genoteca de la placa MIDI de BBN al pocillo correspondiente en la placa de PCR de NL.



PRECAUCIÓN

Si se aspiran las bolas con las puntas de las pipetas, dispense las bolas en la placa con el soporte magnético y espere hasta que el líquido se vuelva transparente (aproximadamente 2 minutos) antes de pasar al siguiente paso del procedimiento.

10. Deseche la placa MIDI de BBN vacía.
11. Agite en vórtex el LNS1 para mezclar.
12. Añada 30 µl de LNS1 en cada pocillo de la genoteca en la nueva placa de PCR de NL.
13. Pipetee para mezclar cinco veces.
14. Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de NL.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
15. Vuelva a almacenar las LNB1, los LNA1, la EE2, el LNW1 y el LNS1.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si debe detener el procedimiento, centrifugue la placa de PCR de NL a 280 × g durante 1 minuto y almacénela entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de 32 días.

Preparación del protocolo

Esta preparación es necesaria para realizar los pasos del protocolo que conducen a la secuenciación.

Empiece la preparación de los consumibles de secuenciación a partir de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (n.º de referencia 20028871) como mínimo una hora antes de su uso.

1. Retire el tampón de dilución de genotecas (HT1) del almacenamiento de -25 °C a -15 °C. Descongele a temperatura ambiente. Después de descongelarlo, manténgalo frío.
2. Siga las instrucciones de preparación del *Guía de referencia del instrumento NextSeq 550Dx* (n.º de documento 1000000009513) para otros consumibles del kit.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
3. Retire los tubos de reactivos de la caja y siga las instrucciones de descongelación.

Tabla 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n.º de referencia 20031121)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
Control PhiX	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Después de descongelarlo, manténgalo frío.	Preparación para la secuenciación

Tabla 33 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n.º de referencia 20031123) además de la TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (n.º de referencia 20140116)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
HP3	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Preparación para la secuenciación
RSB (etiqueta rosa)	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Preparación para la secuenciación

Preparación para la secuenciación

Cada experimento de secuenciación de ADN debe incluir un control positivo y un NTC. Cada uno de los NTC para el ADN se secuencian repetidamente según sea necesario, de modo que cada experimento contenga un NTC. Cada experimento incluye un control positivo diferente.

Preparación

1. Revise las directrices de [Número de genotecas y selección de índices, en la página 33](#).
2. Etiquete un tubo de microcentrifuga como dHP3 (HP3 diluido).
3. Etiquete un tubo de microcentrifuga como dPhiX (PhiX diluido).
4. Precaliente un termobloque a 96 °C para los tubos de microcentrifuga.
5. Prepare una caja de hielo o equivalente.

Desnaturalización y dilución de control PhiX

1. Agite en vórtex el HP3 para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
2. Combine los volúmenes siguientes en el tubo de microcentrifuga dHP3.
 - 10 µl de HP3
 - 190 µl de agua sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa
3. Agite en vórtex el dHP3 para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
4. Invierta el RSB o agítelo en vórtex para mezclar.

5. Agite en vórtex el control PhiX para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
6. Combine los volúmenes siguientes en el tubo de microcentrífuga dPhiX.
 - 8 µl de RSB
 - 2 µl de control PhiX
7. Añada 10 µl de dHP3 al tubo dPhiX.
8. Deseche el tubo dHP3.
9. Agite en vórtex el tubo dPhiX para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
10. Incube el dPhiX a temperatura ambiente durante 5 minutos para desnaturalizar.
11. Agite en vórtex el HT1 para mezclar.
12. Justo después, añada 980 µl de HT1 enfriado previamente al dPhiX.
13. Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
14. Mantenga el dPhiX frío hasta su uso en la preparación para la segunda dilución.
La concentración final es un dPhiX de 20 pM.
15. Vuelva a almacenar el PhiX, HP3 y RSB.

Agrupación y desnaturalización de genotecas

1. Si la placa de PCR de NL estaba almacenada, descongélela a temperatura ambiente y, a continuación, centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.
2. Con ayuda de una pipeta multicanal ajustada a 30 µl, pipetee-mezcle con cuidado las genotecas en la placa de PCR de NL 5 veces.
Use puntas nuevas para cada genoteca.



PRECAUCIÓN

Asegúrese de mezclar bien las genotecas para un rendimiento óptimo.

3. Etiquete un tubo de microcentrífuga como PDL (genotecas de ADN agrupadas).
4. Etiquete un tubo de microcentrífuga como PHL (genotecas de HRD agrupadas).
5. Transfiera 10 µl de cada genoteca de ADN enriquecida con OPD2 desde la placa de NL hasta el tubo PDL.
No agrupe dos genotecas con el mismo cebador de índice.
6. Transfiera 10 µl de cada genoteca de ADN HRD enriquecida con OPD3 desde la placa de NL hasta el tubo PHL.
No agrupe dos genotecas con el mismo cebador de índice.
7. Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de NL.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
8. Agite en vórtex los tubos PDL y PHL para mezclar.
9. Centrifugue brevemente los tubos PDL y PHL.
10. Incube los tubos PDL y PHL en un termobloque a 96 °C durante 2 minutos.

11. Coloque los tubos PDL y PHL en hielo durante 5 minutos.
12. Agite en vórtex los tubos PDL y PHL para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
13. Vuelva a poner en hielo los tubos PDL y PHL.

Preparación de la primera dilución

1. Etiquete un tubo de microcentrifugado como DIL1 (Dilución 1).
2. Transfiera 20 µl de PDL al tubo DIL1 vacío.
3. Deseche el tubo PDL.
4. Añada 5 µl de PHL a DIL1.
5. Añada 475 µl de HT1 preenfriado al tubo DIL1 (dilución 1:20).
6. Agite en vórtex el tubo DIL1 para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
7. Deseche el tubo PHL.
8. **[Solución de problemas]** Después de la secuenciación, si se observan fallos de CC de genotecas sistémicas o a nivel de experimento asociados a la normalización basada en bolas, continúe con [Flujo de trabajo de solución de problemas: Preparación de la segunda dilución ajustada](#), en la página 69.

Preparación de la segunda dilución

1. Etiquete un tubo de microcentrífuga de 2,0 ml como DIL2 (Dilución 2).
2. Transfiera 40 µl de DIL1 al tubo DIL2 vacío.
3. Deseche el tubo DIL1.
4. Añada 1660 µl de HT1 preenfriado al tubo DIL2 (dilución 1:850).
5. Agite en vórtex un dPhiX de 20 pM preparado para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
6. Añada 2,5 µl de dPhiX de 20 pM preparado al tubo DIL2.
7. Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
8. Cargue 1300 µl de DIL2 en el NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles) descongelado. Para obtener más información, consulte *Guía de referencia del instrumento NextSeq 550Dx (n.º de documento 1000000009513)*.
9. Deseche el tubo DIL2.
10. Centrifugue la placa de PCR de NL a 280 × g durante 1 minuto y almacénela a entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de 32 días.
11. Proceda a realizar la secuenciación.
Para obtener más información, consulte *Guía de referencia del instrumento NextSeq 550Dx (n.º de documento 1000000009513)*.

Flujo de trabajo de solución de problemas: Preparación de la segunda dilución ajustada

Utilice este flujo de trabajo de solución de problemas cuando, después de la secuenciación, se observen fallos de CC de genotecas sistémicos o a nivel de experimento asociados a la normalización basada en bolas (consulte [Solución de problemas, en la página 76](#) para obtener más información). Las densidades de grupos fuera del intervalo de 170-220 K/mm² no deben ajustarse a menos que estén asociadas a un fallo de CC. Después de completar el paso *Preparación de la primera dilución*, prepare una segunda dilución con volúmenes DIL1 y HT1 ajustados.

NOTA La segunda dilución ajustada se aplica según la preparación de genotecas. Después de que una densidad de grupos alta o baja provoque un experimento de secuenciación no válido o un CC de genotecas no válido, respectivamente, los experimentos posteriores de la misma preparación de genotecas se pueden ajustar utilizando el mismo valor de densidad de grupos. Los experimentos de una nueva preparación de genotecas siguen el flujo de trabajo estándar.

1. Se utiliza la [Tabla 34](#) para encontrar el intervalo de densidad de grupos (K/mm²) incluido el valor observado en el experimento de secuenciación. Observe el volumen ajustado correspondiente de DIL1 (µl) y HT1 (µl). El volumen de reactivo combinado es siempre de 1700 µl, lo que coincide con el volumen de dilución nominal.

Tabla 34 Ajustes de volumen basados en la densidad del grupo

Intervalo de densidad de grupos (K/mm ²)	Volumen DIL1 (µl)	Volumen HT1 (µl)
≤ 50	199	1501
51-70	169	1531
71-90	123	1577
91-110	95	1605
111-130	76	1624
131-150	63	1637
151-169	53	1647
170-220	40	1660
221-240	31	1669
241-260	28	1672
261-280	25	1675
281-300	22	1678
≥ 300	21	1679

2. Etiquete un tubo de microcentrífuga de 2,0 ml como TDIL2 (Dilución de solución de problemas 2).
3. Transfiera el volumen de DIL1 de la [Tabla 34](#) al tubo TDIL2 vacío.
4. Deseche el tubo DIL1.

5. Añada el volumen de HT1 preenfriado de la [Tabla 34](#) al tubo TDIL2.
6. Agite en vórtex un dPhiX de 20 pM preparado para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
7. Añada 2,5 µl de dPhiX de 20 pM preparado al tubo TDIL2.
8. Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
9. Cargue 1300 µl de TDIL2 en el NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).
Para obtener más información, consulte *Guía de referencia del instrumento NextSeq 550Dx (n.º de documento 1000000009513)*.
10. Deseche el tubo TDIL2.
11. Centrifugue la placa de PCR de NL a 280 × g durante 1 minuto y, a continuación, almacénela a entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de 32 días.
12. Proceda a realizar la secuenciación.
Para obtener más información, consulte *Guía de referencia del instrumento NextSeq 550Dx (n.º de documento 1000000009513)*.

Interpretación de resultados

Los resultados de la secuenciación del ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) se notifican para cada muestra de forma individual en un informe en PDF y un informe en JSON. También se genera a nivel de muestra un Informe de baja profundidad (`LowDepthReport.tsv`).

A nivel de experimento, se generan los siguientes archivos de resultados:

- `ControlOutput.tsv`
- `MetricsOutput.tsv`

En los informes en PDF y en JSON solo aparecen las variantes que superan el control de calidad.

Para obtener información detallada sobre el análisis, consulte *Guía de flujo de trabajo de Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) Analysis Module (n.º de documento 200080937)*.

Resultados de la prueba diagnóstica acompañante

Para el uso previsto del CDx, existen tres posibles resultados:

- **Positivo:** Se detecta una variante o un biomarcador (CDx).
- **Sin detección:** No se detectan variantes ni biomarcadores asociados con el uso previsto de la CDx en la muestra. El tipo de cáncer seleccionado para la muestra es adecuado para la CDx.
- **Sin resultado:** No es posible determinar un estado de variante o biomarcador por uno o más de los siguientes motivos:
 - El experimento de secuenciación no ha superado las especificaciones del control de calidad.
 - La genoteca no ha superado las especificaciones del control de calidad requeridas. Para las categorías de CC que superaron, no se detectaron variantes diagnósticas ni biomarcadores acompañantes.

- La genoteca no cumplió las especificaciones requeridas para el NTC y el control positivo.

Todos los resultados de la CDx se dan a conocer en la sección Resultados de prueba diagnóstica acompañante del informe en JSON. En la sección Resultados de prueba diagnóstica acompañante del informe en PDF solo se citan los resultados positivos.

Control de calidad

El experimento de secuenciación, la genoteca y la validez de control se determinan automáticamente y se informan mediante el TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) analysis module. Consulte la [Tabla 35](#) y la [Tabla 36](#) para obtener información sobre las métricas y especificaciones de CC aplicadas al experimento de secuenciación, la genoteca y los controles. Si el control positivo o el NTC no cumplen las especificaciones, el software invalida automáticamente las muestras de pacientes en función de los resultados de las muestras de control. Para obtener información detallada sobre el análisis, consulte *Guía de flujo de trabajo de Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) Analysis Module (n.º de documento 200080937)*. El informe de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN), que está disponible en los formatos en PDF y JSON, resume los resultados del control de calidad. Los archivos del informe están en la carpeta del análisis. Consulte *Guía de flujo de trabajo de Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) Analysis Module (n.º de documento 200080937)* para ver la ubicación de la carpeta del análisis (contiene informes en PDF y JSON) y la carpeta del experimento.

Los experimentos de secuenciación y las genotecas no válidos deben repetirse. Para obtener más información sobre la repetición de los experimentos de secuenciación o ensayos de genotecas, consulte [Solución de problemas, en la página 76](#). Tome todas las medidas adicionales para el control de calidad según el sistema de control de calidad del laboratorio en virtud de la regulación local, estatal o federal, o en virtud de los requisitos de acreditación.

Para obtener información sobre la cuantificación de ácidos nucleicos y los requisitos mínimos de materiales de entrada, consulte [Extracción, cuantificación y almacenamiento de ácido nucleico, en la página 23](#).

Tabla 35 Criterios de medición de CC de los resultados del informe de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)

Tipo de resultado	Criterio de medición	Especificación	Descripción	Repercusión de no cumplir la especificación*
Experimento de secuenciación	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Porcentaje de lecturas que pasan el filtro (PF).	Ejecución de secuenciación invalidada. No se han notificado resultados para ninguna muestra del ciclo.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Porcentaje promedio de llamadas de bases con una puntuación de calidad de Q30 o superior para la Lectura 1.	
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Porcentaje promedio de llamadas de bases con una puntuación de calidad de Q30 o superior para la Lectura 2.	

Tipo de resultado	Criterio de medición	Especificación	Descripción	Repercusión de no cumplir la especificación*
Genotecas de ADN	CONTAMINATION_SCORE	≤ 1457	La puntuación de contaminación en función de la distribución de la frecuencia alélica de variantes (VAF, Variant Allele Frequency) de SNP.	No se notifican resultados de ADN.

Tipo de resultado	Criterio de medición	Especificación	Descripción	Repercusión de no cumplir la especificación*
	MEDIAN_INSERT_SIZE (pb)	≥ 70	La mediana de la longitud del fragmento en la muestra	No se notifican resultados de variantes pequeñas de ADN en BRCA.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (recuento)	≥ 150	Mediana de la cobertura de fragmentos de exones en todas las bases de exones.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Porcentaje de bases de exones con cobertura de fragmentos 50X.	
	PCT_CHIMERIC_READS (%)	≤ 8	Porcentaje de lecturas quiméricas.	No se notificaron resultados de grandes reordenamientos de BRCA.
	GENE_SCALED_MAD (recuento)	$0 \leq x \leq 0,134$	La mediana de las desviaciones absolutas del recuento normalizado de cada región de interés de variante en el número de copias (CNV).	
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNVTARGET (recuento)	$\geq 1,0$	La mediana del recuento bruto de grupos por CNV objetivo.	
	PCT_TARGET_HRD_50X (%)	$\geq 50,0$	Porcentaje de sondas de HRD con cobertura de fragmentos 50X.	No se ha notificado ningún resultado de GIS.
	EXCESSIVE_TF (recuento)	≤ 0	Indicador del modo de error que indica si la fracción tumoral es excesiva y las señales tumorales y normales ya no se pueden diferenciar para calcular la GIS.	

* Si los resultados son satisfactorios, se muestra PASS (SUPERADO).

Tabla 36 Criterios de medición de control de los resultados del informe de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)

Tipo de resultado	Criterio de medición	Especificación	Repercusión de no cumplir la especificación*
Control positivo de ADN	Sensibilidad de variantes pequeñas de ADN	51 de 54 variantes especificadas detectadas	El software invalida de forma automática las muestras de los pacientes según los resultados de las muestras de control. No se notifican resultados de variantes pequeñas de ADN en BRCA.
	Sensibilidad de amplificación génica	3 de 3 variantes especificadas detectadas	El software invalida de forma automática las muestras de los pacientes según los resultados de las muestras de control. No se notificaron resultados de grandes reordenamientos de BRCA.
	PCT_ TARGET_ HRD_50X (%)	≥ 50	El software invalida de forma automática las muestras de los pacientes según los resultados de las muestras de control. No se ha notificado ningún resultado de GIS.
DNA No-Template Control (Control negativo de ADN)	MEDIAN_ EXON_ COVERAGE	≤ 8	El software invalida de forma automática las muestras de los pacientes según los resultados de las muestras de control. No se notificaron resultados de variantes pequeñas de ADN de BRCA y reordenaciones grandes de BRCA.
	MEDIAN_ TARGET_ COVERAGE	≤ 2	El software invalida de forma automática las muestras de los pacientes según los resultados de las muestras de control. No se ha notificado ningún resultado de GIS.

* Si los resultados son satisfactorios, se muestra PASS (SUPERADO).

Solución de problemas

Use la [Tabla 37](#) para solucionar los problemas que surjan durante el flujo de trabajo. Si un experimento de secuenciación o la preparación de genotecas para una muestra falla dos veces, puede ser necesaria una resolución de problemas adicional. Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

Antes de realizar las acciones de solución de problemas recomendadas, tenga en cuenta las dos categorías generales de causas para las genotecas que no superan las especificaciones de control de calidad (CC). Cuando las genotecas de ADN no superan el CC, la causa subyacente suele ser *específica de la muestra o del pocillo* o *sistémica* para el flujo de trabajo.

Los errores específicos de la muestra o del pocillo pueden deberse a errores de manipulación o a la calidad inherente de la muestra. Pueden surgir errores sistémicos por el uso, el equipo, los reactivos o la manipulación

de reactivos, y pueden afectar a varias genotecas. Aunque los errores sistémicos son más probables cuando todas las genotecas no superan el CC, la variabilidad en la calidad de la muestra puede dar lugar a errores sistémicos que afectan solo a un subconjunto de genotecas o a una sola genoteca.

Analice las siguientes mediciones para identificar la fuente probable del resultado no válido.

- Inspeccione el total de lecturas PF (medición ampliada) de cada genoteca desde `MetricsOutput.tsv`. Valores similares indican un problema sistémico, mientras que un total de lecturas PF bajo para una o varias muestras, incluidas las muestras que no superan el control de calidad de la genoteca, sugiere un problema de muestra o pocillo.
- Inspeccione las lecturas PF para el control positivo de ADN en `<run folder>/<analysis folder>/Logs_Intermediates/DnaQCMetrics/<control ID>/<control ID-DNA.aligned.metrics.json>` y compare la medición con los valores históricos. Una reducción de esta métrica para un control positivo podría ser indicativa de un problema sistémico.

Si un experimento de secuenciación no supera las especificaciones de control de calidad del experimento, la causa es un error sistémico.

Tabla 37 Solución de problemas de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)

Observación	Causa posible	Acción recomendada
El experimento de secuenciación no supera las especificaciones del control de calidad.	- Error de agrupación - Error de dilución - Problemas con la preparación de consumibles de secuenciación (por ejemplo, no descongelados adecuadamente, condensación/residuos en la celda de flujo)	Vuelva a secuenciar las genotecas de la placa de PCR de genotecas normalizadas (NL). Consulte Preparación para la secuenciación, en la página 67 .

Observación	Causa posible	Acción recomendada
	Normalización basada en bolas: densidad de grupos elevada	Si se sospecha alguno de los errores indicados, corrija el problema y vuelva a secuenciar las genotecas de la placa de PCR de genotecas normalizadas (NL). Consulte Preparación para la secuenciación, en la página 67. Si no se sospecha ninguno de los demás errores indicados, la concentración de bolas del tubo de reactivo LNB1 puede haber causado una densidad de grupos elevada. Esto podría deberse a una mezcla insuficiente de las bolas. Busque el valor de densidad de grupos en <code>RunCompletionStatus.xml</code> en la carpeta del experimento. El intervalo de densidad de grupos óptimo es de 170-220 K/mm², pero los valores más altos aún pueden producir experimentos que superen las especificaciones de CC. Si la densidad del grupo está por encima del intervalo óptimo y el experimento de secuenciación no superó las especificaciones de CC, las genotecas de la placa de PCR de genotecas normalizadas (NL) se pueden volver a secuenciar y ajustar a la segunda dilución. Repita Preparación para la secuenciación, en la página 67 y siga las instrucciones para la solución de problemas.

Observación	Causa posible	Acción recomendada
Error con generación de informe o error de instrumento general (error en la red, errores en la carga/descarga de reactivos, etc.).	Problemas con el software o con el instrumento.	Consulte <i>Guía de flujo de trabajo de Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) Analysis Module (n.º de documento 200080937)</i> para obtener ayuda con la generación de informes. Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina para obtener asistencia adicional.
La genoteca de ADN no supera las especificaciones del control de calidad.	No se han cumplido los requisitos de entrada de muestras.	Asegúrese de seleccionar una entrada de muestras adecuada y repita la preparación de genotecas desde el paso Fragmentación del ADNg. Consulte Requisitos de la muestra, en la página 23 y Extracción, cuantificación y almacenamiento de ácido nucleico, en la página 23 .
	Error en el uso o en el equipo laboratorio en el flujo de trabajo del ensayo.	Repita la preparación de genoteca a partir de uno de los siguientes pasos, según dónde se sospecha que se produjo el error en el equipo o uso. Si se desconoce o se producen otros errores, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina para iniciar la solución de problemas en su experimento. • Vuelva a secuenciar las genotecas de la placa de PCR de genotecas normalizadas (NL). Consulte Preparación para la secuenciación, en la página 67. • Comience la preparación de genotecas a partir del inicio del flujo de trabajo. Consulte Fragmentación del ADNg, en la página 40.

Observación	Causa posible	Acción recomendada
La genoteca de ADN no supera las especificaciones del control de calidad (continuación).	No se cumplen los criterios de CONTAMINATION_SCORE.	Consulte los avisos y precauciones para obtener información acerca de cómo evitar la contaminación cruzada. Revise el diseño de la placa y la indexación de genotecas para asegurarse de que las muestras del mismo índice no se secuencien juntas. Para las muestras afectadas, inicie la preparación de genotecas desde el comienzo del flujo de trabajo. Consulte Fragmentación del ADNg, en la página 40. La contaminación puede haberse producido durante la extracción de muestras. Puede ser necesario repetir la extracción para asegurarse de que la muestra no esté contaminada.

Observación	Causa posible	Acción recomendada
	La muestra puede estar fragmentada en exceso o presentar ácido nucleico dañado, lo que afecta a la capacidad de generar suficientes genotecas únicas.	Revise Ajustes de configuración del ultrasonicador para la fragmentación del ADN, en la página 20 y los ajustes del fabricante del ultrasonicador para el uso y el funcionamiento (incluidos el nivel del agua y el tipo de tubo). Asegúrese de seleccionar una entrada de muestras adecuada en el ensayo. Consulte Requisitos de la muestra, en la página 23 y Extracción, cuantificación y almacenamiento de ácido nucleico, en la página 23. Puede ser necesaria una nueva extracción de muestras o repetir el paso de fragmentación del ADNg si la muestra está fragmentada en exceso o si está dañada.
	• Error de agrupación. • Error de dilución. • Desnaturalización térmica incompleta de PDL/PHL.	Descarte las causas relacionadas con el ADN enumeradas anteriormente (p. ej., entrada de muestras, calidad de las muestras, equipo). Vuelva a secuenciar las genotecas de la placa de PCR de genotecas normalizadas (NL). Consulte Preparación para la secuenciación, en la página 67.

Observación	Causa posible	Acción recomendada
La genoteca de ADN no supera las especificaciones del control de calidad (continuación).	Normalización basada en bolas (densidad de grupos baja).	Si no se sospecha ninguna de las otras causas posibles de fallo del CC de la genoteca, la concentración de bolas del tubo de reactivo LNB1 puede haber causado una baja densidad de grupos debido a una mezcla insuficiente. Busque y registre el valor de densidad de grupos en <code>RunCompletionStatus.xml</code> en la carpeta del experimento. Si la densidad de grupos es inferior a 170 K/mm ² y se sospecha una normalización sistémica basada en bolas (incluida la evidencia de lecturas de PF totales para los controles positivos), vuelva a secuenciar las genotecas de la placa de PCR de genotecas normalizadas (NL) y siga las instrucciones para una segunda dilución ajustada. Consulte Preparación para la secuenciación, en la página 67 y Flujo de trabajo de solución de problemas: Preparación de la segunda dilución ajustada, en la página 69 .
	Error en el flujo de trabajo de preparación de genotecas durante o antes del paso de indexación de PCR.	Comience la preparación de genotecas a partir del inicio del flujo de trabajo. Consulte Fragmentación del ADNg, en la página 40 .

Observación	Causa posible	Acción recomendada
	• Uso incorrecto de sondas de enriquecimiento. • Error en el flujo de trabajo de preparación de genotecas durante o después del primer paso de hibridación.	Un error sistémico de grupo de sondas (p. ej., intercambio de grupos de sondas) podrían dar lugar a un número total normal de lecturas que pasan el filtro, pero que la cobertura mediana de exones no cumpla los criterios de CC. Comience la preparación de genotecas a partir del inicio del flujo de trabajo. Consulte Fragmentación del ADNg, en la página 40.

Observación	Causa posible	Acción recomendada
Fallo en el control positivo.	No se han cumplido los requisitos de entrada de muestras para el control positivo.	Asegúrese de seleccionar una entrada adecuada en el ensayo. Revise el diseño de la placa y asegúrese de usar los reactivos correctos (sondas, índices) en los pocillos correctos. Garantice que haya una muestra de control positivo almacenada según lo indicado en la etiqueta. Para todas las muestras que compartan el control positivo, repita la preparación de genotecas desde uno de los siguientes pasos según dónde se haya producido el supuesto error de uso o de equipo. Si se desconoce o se producen otros errores, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina para iniciar la solución de problemas en su experimento. • Vuelva a secuenciar las genotecas de la placa de PCR de genotecas normalizadas (NL). Consulte Preparación para la secuenciación, en la página 67. • Comience la preparación de genotecas a partir del inicio del flujo de trabajo. Consulte Fragmentación del ADNg, en la página 40.
	Error en el uso o en el equipo laboratorio en el flujo de trabajo del ensayo.	

Observación	Causa posible	Acción recomendada
Fallo de CC.	Se produjo contaminación cruzada o contaminación en las zonas de trabajo.	Consulte la sección Avisos y precauciones para obtener información sobre cómo descontaminar las zonas de trabajo y evitar la contaminación cruzada. Revise el diseño de la placa y la indexación de genotecas para asegurarse de que las muestras del mismo índice no se secuencien juntas. Repita la preparación de genotecas desde el comienzo del flujo de trabajo para todas las genotecas que compartan el control sin cadena molde.
	Indexación de genoteca incorrecta.	
Los controles positivos o negativos en el experimento de secuenciación se analizaron como muestras sin control.	Asignación incorrecta del tipo de muestra durante la configuración del experimento de secuenciación.	Vuelva a poner en cola el análisis con los controles correctamente identificados en la Guía de flujo de trabajo del módulo de análisis (consulte <i>Guía de flujo de trabajo de Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) Analysis Module (n.º de documento 200080937)</i>).

Características de rendimiento

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) es un ensayo que permite la evaluación de HRD utilizando ADN extraído de muestras de tejido tumoral FFPE de pacientes con cáncer de ovario. Utiliza dos paneles NGS. Un panel se utiliza para la detección de alteraciones perjudiciales y presuntamente perjudiciales en los genes BRCA1 y BRCA2, incluidas variantes pequeñas de ADN y grandes reordenaciones. Se utiliza un segundo panel de NGS para medir la inestabilidad genómica, que se notifica como GIS. BRCA positivo se define como la detección de una alteración perjudicial o presuntamente perjudicial en genes BRCA1 o BRCA2. El resultado positivo para GIS se define como un GIS ≥ 42 . La expresión de HRD se define como la expresión de BRCA o GIS positiva.

Las muestras FFPE con variantes CDx positivas específicas se incluyeron en los estudios.

Intervalos de confianza (IC) bilateral del 95 % calculados utilizando el método de puntuación de Wilson, a menos que se indique lo contrario.

La [Tabla 38](#) proporciona las definiciones de los criterios de medición calculados en diversos estudios.

Tabla 38 Definiciones de los criterios de medición

Término	Definición
Concordancia porcentual positiva (PPA)	El porcentaje de resultados positivos del método comparador en el que TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) es positivo.
Concordancia porcentual negativa (NPA)	El porcentaje de resultados negativos del método comparador en el que TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) es negativo.
Porcentaje de llamadas positivas (PPC)	El porcentaje de observaciones que son positivas para una región de interés entre las observaciones que se espera que sean positivas para la región objetivo.
Porcentaje de llamadas negativas (PNC)	El porcentaje de observaciones que son negativas para una región de interés entre las observaciones que se espera que sean negativas para la región objetivo.
n/N	El número de observaciones positivas o negativas (n) dividido entre las observaciones totales (N) para calcular el PPC o el PNC, respectivamente. Los valores de n y N pueden estar en diferentes niveles (p. ej., variante o gen) o combinados en un grupo (p. ej., SNV).
Desviación estándar (SD)	Medida de la variación de los valores de una variable en torno a su media.
Porcentaje de coeficiente de variación (% de CV)	Desviación estándar dividida por la media en forma de porcentaje.

Exactitud

La precisión del ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) para detectar la HRD en pacientes con cáncer de ovario se demostró evaluando la concordancia del estado de HRD, el estado de GIS y los resultados del estado de BRCA entre el ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) y un ensayo comparativo validado basado en NGS. La precisión se calculó en relación con el método ortogonal; se calcularon el PPA, el NPA y el IC bilateral de la puntuación de Wilson del 95 % asociado.

Hubo 175 muestras de ADN FFPE de cáncer de ovario analizadas con el ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) o el método ortogonal. Una muestra tuvo resultados no válidos para TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) y otra muestra tuvo resultados de ensayo comparativo no válidos. El conjunto de datos evaluable para el estado de GIS y HRD fue de 173 muestras. El conjunto de datos evaluable para el estado de BRCA fue de 169 debido a la exclusión de cuatro muestras adicionales con variantes de BRCA fuera del intervalo de medición del ensayo TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Los análisis de concordancia basados en resultados de pruebas válidos se muestran en la [Tabla 39](#), la [Tabla 40](#) y la [Tabla 41](#).

Tabla 39 Concordancia entre el ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) y el método comparador para la detección del estado de HRD

		Resultado del método de comparación		
		Positivo para HRD	Negativo para HRD	Total
Resultado del ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)	Positivo para HRD	97	6	103
	Negativo para HRD	6	64	70
	Total	103	70	173
Estadísticas de coincidencia	% de PPA (n/N; IC del 95 %)	94,2 % (97/103; 87,9 %, 97,3 %)		
	% de NPA (n/N; IC del 95 %)	91,4 % (64/70; 82,5 %, 96,0 %)		

Tabla 40 Concordancia entre el ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) y el método comparador para la detección del estado de GIS

		Resultado del método de comparación		
		Positivo en GIS	Negativo en GIS	Total
Resultado del ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)	Positivo en GIS	95	3	98
	Negativo en GIS	6	69	75
	Total	101	72	173
Estadísticas de coincidencia	% de PPA (n/N; IC del 95 %)	94,1 % (95/101; 87,6 %, 97,2 %)		
	% de NPA (n/N; IC del 95 %)	95,8 % (69/72; 88,5 %, 98,6 %)		

Tabla 41 Concordancia entre el ensayo TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) y el método comparador para la detección del estado de BRCA

		Resultado del método de comparación		
		Positivo para BRCA	Negativo para BRCA	Total
Resultado del ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)	Positivo para BRCA	40	8	48
	Negativo para BRCA	2	119	121
	Total	42	127	169
Estadísticas de coincidencia	% de PPA (n/N; IC del 95 %)	95,2 % (40/42; 84,2 %, 98,7 %)		
	% de NPA (n/N; IC del 95 %)	93,7 % (119/127; 88,1 %, 96,8 %)		

Reproducibilidad

La reproducibilidad y repetibilidad del ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) se evaluó en tres centros de análisis externos con dos técnicos por centro, dos réplicas dentro del experimento, tres lotes y tres días no consecutivos. En cada uno de los tres centros, dos técnicos realizaron pruebas de forma independiente en instrumentos NextSeq 550Dx separados. Las pruebas se realizaron con un panel de reproducibilidad de 27 elementos que contenía ADN extraído de muestras de tejido ovárico FFPE con mutaciones de BRCA1 y BRCA2 conocidas o GIS.

De los 27 elementos del panel, 16 elementos del panel se analizaron para detectar variantes pequeñas de ADN en los genes BRCA, que incluyen: SNV, variantes en regiones de homopolímero ≥ 5 pb, inserciones y deleciones < 10 pb, e inserciones y deleciones ≥ 10 pb. Para el tipo de variante LR de BRCA, se utilizaron dos elementos del panel para las variantes LR de BRCA < 3 exones y un elemento del panel para las variantes LR de BRCA ≥ 3

exones. Para GIS, tres elementos del panel representaban el estado de GIS alto (+), tres elementos del panel representaron GIS (-), dos elementos del panel representaron GIS bajo (+), y uno de los elementos del panel que ya representaba las variantes LR < 3 exones también representó a un elemento con GIS bajo (+). En cada centro, cada técnico probó los elementos del panel durante el transcurso de tres días no consecutivos, generando seis observaciones por objetivo por elemento del panel. A partir de los 3 centros, se generaron 36 observaciones por elemento del panel (3 centros × 2 técnicos/instrumentos × 3 días × 2 réplicas dentro del experimento).

Se determinaron la PPC y la PNC para los elementos del panel selectivos. Se realizaron análisis para estimar la PPC y la PNC (con IC del 95 %) combinando los resultados de seis técnicos en tres centros. Para cada variante pequeña de ADN selectiva y variante de LR, se combinaron las observaciones del ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) en los elementos del panel que se esperaba que fueran negativos para la variante selectiva para calcular el PNC. Las observaciones del ensayo TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) en los elementos del panel GIS (-) se combinaron para calcular el PNC para los elementos del panel GIS (-).

Pequeñas variantes de ADN en BRCA

Los valores de PPC tanto para los elementos del panel de variantes pequeñas de ADN de BRCA de alto nivel (2-3×C95) como de bajo nivel (1-1,5×C95) fueron del 100 % ([Tabla 42](#)). Los valores de PNC para los elementos del panel de variantes pequeñas de ADN de BRCA también fueron del 100 % ([Tabla 43](#)).

Tabla 42 PPC para variantes pequeñas de ADN de BRCA de regiones de interés por nivel de variante y clase de variante

Nivel de variantes	Clase de variante	Variante de regiones de interés	Media de la VAF	PPC (%) (n/N)	IC del 95 %
Alto	SNV	BRCA1 p.(A1708E)	0.129	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 c.80+1G>A	0.121	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Variantes en homopolímeros ≥ 5 pb	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	0.248	100 (34/34)	(89,8, 100)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	0.239	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Inserción o delección (< 10 pb)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	0,166	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	0.153	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Inserción o delección (≥ 10 pb)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	0.189	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	0.141	100 (33/33)	(89,6, 100)
Bajo	SNV	BRCA1 p.(A1708E)	0.087	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 c.80+1G>A	0.087	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Variantes en homopolímeros ≥ 5 pb	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	0.147	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	0.142	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Inserción o delección (< 10 pb)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	0.121	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	0.122	100 (35/35)	(90,1, 100)
	Inserción o delección (≥ 10 pb)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	0.109	100 (35/35)	(90,1, 100)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	0,111	100 (36/36)	(90,4, 100)

Tabla 43 PNC para variantes de ADN pequeñas de BRCA de regiones de interés por clase de variante

Clase de variante	Variante de regiones de interés	PNC (%) (n/N)	IC del 95 %
SNV	BRCA1 p.(A1708E)	100 (585/585)	(99,3, 100)
	BRCA1 c.80+1G>A	100 (557/557)	(99,3, 100)
Variantes en homopolímeros ≥ 5 pb	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	100 (566/566)	(99,3, 100)
	BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	100 (492/492)	(99,2, 100)
Inserción o delección (< 10 pb)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	100 (627/627)	(99,4, 100)
	BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	100 (632/632)	(99,4, 100)
Inserción o delección (≥ 10 pb)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	100 (584/584)	(99,3, 100)
	BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	100 (634/634)	(99,4, 100)

La [Tabla 44](#) muestra el análisis de los componentes de varianza por fuente de variación para niveles altos y bajos para cada clase de variante pequeña de ADN de BRCA. La media de la VAF en las variantes pequeñas de ADN de BRCA de regiones de interés de alto nivel osciló entre 0,121 y 0,248, y las variantes pequeñas de ADN de BRCA de regiones de interés de bajo nivel oscilaron entre 0,087 y 0,147. La SD total en las variantes pequeñas de ADN de BRCA de regiones de interés osciló entre 0,019 (CV del 11,4 %) y 0,041 (CV del 28,7 %) para las variantes pequeñas de ADN de BRCA de alto nivel, y entre 0,016 (CV del 18,9 %) y 0,043 (CV del 30,1 %) para las variantes pequeñas de ADN de BRCA de bajo nivel.

Tabla 44 Análisis de los componentes de la varianza de la VAF para las variantes pequeñas de ADN de BRCA de regiones de interés

Nivel de variantes	Clase de variante	Variante de regiones de interés	N	Media de la VAF	SD de centro (% de CV)	SD del técnico/instrumento (% de CV)	SD de día (% de CV)	SD de lote (% de CV)	SD de repetibilidad (% de CV)	SD de componentes totales (% de CV)
Alto	SNV	BRCA1 p.(A1708E)	36	0.129	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,007 (5,5)	0,000 (0,0)	0,020 (15,4)	0,021 (16,3)
		BRCA1 c.80+1G>A	36	0.121	0,007 (5,5)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,023 (19,2)	0,024 (19,9)
	Variantes de homopolímeros ≥ 5 pb	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	34	0.248	0,000 (0,0)	0,011 (4,3)	0,008 (3,3)	0,000 (0,0)	0,025 (10,1)	0,029 (11,5)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	36	0.239	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,006 (2,5)	0,000 (0,0)	0,041 (17,0)	0,041 (17,1)
	Inserciones o deleciones < 10 pb	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	36	0.166	0,006 (3,7)	0,005 (3,2)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (10,3)	0,019 (11,4)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	36	0.153	0,008 (5,1)	0,000 (0,0)	0,013 (8,5)	0,000 (0,0)	0,020 (12,9)	0,025 (16,3)
	Inserciones o deleciones ≥ 10 pb	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	36	0.189	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,006 (3,3)	0,015 (8,0)	0,033 (17,5)	0,037 (19,6)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	33	0.141	0,000 (0,0)	0,013 (9,5)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,038 (27,1)	0,041 (28,7)
	SNV	BRCA1 p.(A1708E)	36	0.087	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,003 (3,0)	0,000 (0,0)	0,016 (18,7)	0,016 (18,9)
		BRCA1 c.80+1G>A	36	0.087	0,003 (3,7)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,019 (22,0)	0,019 (22,3)
Bajo	Variantes de homopolímeros ≥ 5 pb	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	36	0.147	0,000 (0,0)	0,003 (2,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,021 (14,0)	0,021 (14,1)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	36	0.142	0,011 (8,0)	0,000 (0,0)	0,010 (7,2)	0,015 (10,7)	0,037 (26,0)	0,043 (30,1)
	Inserciones o deleciones < 10 pb	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	36	0.121	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,004 (3,7)	0,017 (14,0)	0,017 (14,5)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	35	0.122	0,004 (3,4)	0,007 (5,6)	0,000 (0,0)	0,006 (5,0)	0,021 (16,9)	0,023 (18,8)
	Inserciones o deleciones ≥ 10 pb	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	35	0.109	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,007 (6,5)	0,006 (5,5)	0,026 (24,3)	0,028 (25,8)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	36	0.111	0,000 (0,0)	0,006 (5,7)	0,000 (0,0)	0,006 (5,7)	0,029 (26,0)	0,030 (27,2)

Variantes de reordenación grandes en BRCA

Los valores de PPC para LR de BRCA de regiones de interés fueron del 100 % (29/29) para LR de BRCA2 $\geq$ 3 exones, del 97,2 % (35/36) para LR de BRCA2 < 3 exones y del 94,3 % (33/35) para LR de BRCA1 < 3 exones (Tabla 45). Los valores de PNC para los LR de BRCA de regiones de interés fueron del 98,9 % (630/637) para BRCA1 y del 100 % (607/607) para BRCA2 (Tabla 46).

Tabla 45 PPC para LR de BRCA de regiones de interés por clase de variante

Clase de variante	Variante de regiones de interés	Media de la VAF	PPC (%) (n/N)	IC del 95 %*
LR $\geq$ 3 exones	PÉRDIDA DE BRCA2	0.448	100 (29/29)	(88,3, 100)
LR < 3 exones	PÉRDIDA DE BRCA2	0.602	97,2 (35/36)	(85,8, 99,5)
	PÉRDIDA DE BRCA1	0.680	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)

Tabla 46 PNC para LR de BRCA de regiones de interés

Variante de regiones de interés	PNC (%) (n/N)	IC del 95 %*
PÉRDIDA DE BRCA1	98,9 (630/637)	(97,7, 99,5)
PÉRDIDA DE BRCA2	100 (607/607)	(99,4, 100)

La Tabla 47 muestra el análisis de componentes de varianza por fuente de variación para cada clase de LR de BRCA. La media de la VAF para la variante de LR $\geq$ 3 exones fue de 0,448 con una SD total de 0,026 (CV del 5,7 %). La media de la VAF para las variantes de LR < 3 exones osciló entre 0,602 y 0,680, y la SD total osciló entre 0,038 (CV del 6,3 %) y 0,079 (CV del 11,6 %).

Tabla 47 Análisis de componentes de varianza de VAF en LR de BRCA de regiones de interés

Clase de variante	Variante de regiones de interés	N	Media de la VAF	SD del centro (% de CV)	Técnico / Instrumento SD (% de CV)	SD de día (% de CV)	SD de lote (% de CV)	Repetibilidad SD (% de CV)	SD de componentes totales (% de CV)
LR $\geq$ 3 exones	PÉRDIDA DE BRCA2	29	0.448	0,000 (0,0)	0,005 (1,1)	0,013 (2,9)	0,000 (0,0)	0,022 (4,8)	0,026 (5,7)
LR < 3 exones	PÉRDIDA DE BRCA2	36	0.602	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,015 (2,5)	0,000 (0,0)	0,035 (5,8)	0,038 (6,3)
	PÉRDIDA DE BRCA1	35	0.680	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,048 (7,1)	0,000 (0,0)	0,062 (9,2)	0,079 (11,6)

Puntuación de inestabilidad genómica (GIS)

Los valores de PPC fueron del 100 % para los elementos del panel de GIS alta (+). Los elementos del panel de GIS (+) baja tenían valores de PPC que oscilaban entre el 94,4 % y el 100 % (Tabla 48). Los valores de PNC fueron del 100 % en todos los elementos del panel de GIS (-) (Tabla 49).

Tabla 48 PPC para GIS por estado de GIS de regiones de interés y elemento del panel

Estado de GIS de regiones de interés	GIS de regiones de interés	GIS media	PPC (%) (n/N)	IC del 95 %*
GIS alta (+)	69.8	70.2	100 (36/36)	(90,4, 100)
	59.5	60.1	100 (36/36)	(90,4, 100)
	63.7	61.7	100 (36/36)	(90,4, 100)
GIS baja (+)	47.2	46.3	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	52.7	53.1	100 (36/36)	(90,4, 100)
	53.0	52.5	100 (36/36)	(90,4, 100)

Tabla 49 PNC para elementos del panel de regiones de interés negativos para GIS

Estado de GIS de regiones de interés	GIS de regiones de interés	GIS media	PNC (%) (n/N)	IC del 95 %*
GIS (-)	24.5	23.3	100 (36/36)	(90,4, 100)
	(19,2)	18,2	100 (36/36)	(90,4, 100)
	19.5	21.0	100 (36/36)	(90,4, 100)

La [Tabla 50](#) muestra el análisis de los componentes de varianza por fuente de variación para cada elemento del panel de GIS alta (+), GIS baja (+) y GIS (-) de regiones de interés. La media de GIS en los elementos del panel de regiones de interés de GIS osciló entre 60,1 y 70,2 para GIS alta (+), entre 46,3 y 53,1 para GIS baja (+) y entre 18,2 y 23,3 para GIS (-). La SD total en los elementos del panel de GIS de regiones de interés osciló entre 2,5 (CV del 3,5 %) y 3,2 (CV del 5,2 %) para GIS alta (+), entre 1,5 (CV del 2,9 %) y 3,8 (CV del 7,2 %) para GIS baja (+) y entre 2,5 (CV del 11,7 %) y 3,3 (CV del 14,1 %) para GIS (-).

Tabla 50 Análisis de los componentes de varianza de la GIS en los elementos del panel de regiones de interés

Estado de GIS de regiones de interés	GIS de regiones de interés	N	GIS media	SD del centro (% de CV)	Técnico / Instrumento SD (% de CV)	SD de día (% de CV)	SD de lote (% de CV)	Repetibilidad SD (% de CV)	SD de componentes totales (% de CV)
GIS alta (+)	69.8	36	70.2	0,0 (0,0)	1,2 (1,7)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	2,2 (3,1)	2,5 (3,5)
	59.5	36	60.1	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,0 (1,7)	0,0 (0,0)	2,7 (4,4)	2,8 (4,7)
	63.7	36	61.7	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,9 (1,5)	0,0 (0,0)	3,1 (5,0)	3,2 (5,2)
GIS baja (+)	47.2	36	46.3	0,0 (0,0)	1,7 (3,7)	0,0 (0,0)	0,7 (1,6)	2,8 (6,1)	3,4 (7,3)
	52.7	36	53.1	0,9 (1,7)	1,2 (2,3)	0,0 (0,0)	0,4 (0,8)	3,5 (6,5)	3,8 (7,2)
	53.0	36	52.5	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,5 (2,9)	1,5 (2,9)
GIS (-)	24.5	36	23.3	0,9 (3,7)	1,6 (6,9)	1,6 (7,0)	0,9 (3,7)	2,0 (8,7)	3,3 (14,1)
	(19,2)	36	18,2	0,7 (3,7)	0,0 (0,0)	0,6 (3,5)	0,1 (0,4)	2,4 (13,4)	2,6 (14,4)
	19.5	36	21.0	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,6 (3,0)	1,3 (6,3)	2,0 (9,4)	2,5 (11,7)

Límite del blanco

El porcentaje de falsos positivos (de los negativos previstos totales) se evaluó mediante pruebas repetidas de tejido ovárico adyacente benigno FFPE. Se esperaba que el tejido fuera negativo para GIS y que no contuviera mutaciones perjudiciales o presuntamente perjudiciales en BRCA1 y BRCA2 (variantes pequeñas de ADN y LR). Se analizaron siete muestras de ADN FFPE de ovario benigno por duplicado con dos técnicos durante tres días para cada uno de los dos lotes de reactivos en formato de 8 unidades de plexado. Un subconjunto de muestras se reagrupó y resecuenció en un formato de 3 unidades de plexado para evaluar los positivos falsos con varias configuraciones de multiplexado admitidas por este dispositivo. En total, hubo 168 observaciones posibles. El porcentaje de positivos falsos se calculó a nivel de posición para las variantes pequeñas de ADN en BRCA (aproximadamente 3 millones de posiciones), a nivel de gen para LR de BRCA y a nivel de muestra para GIS. El porcentaje de positivos falsos para los tipos de variantes de ADN se muestra en la [Tabla 51](#).

Tabla 51 Positivos falsos por tipo de variante de ADN

Tipo de variante	Positivos falsos*
Variantes pequeñas de ADN de BRCA	0 % (0/3,076,657)
LR de BRCA	0 % (0/384)
GIS	0 % (0/192)

* Los denominadores son totales de experimentos de 8 y 3 unidades de plexado.

Límite de detección

El límite de detección (LoD) de las variantes pequeñas de ADN de BRCA (SNV, inserciones o deleciones ≥ 10 pb, inserciones o deleciones < 10 pb, variantes en regiones de homopolímero ≥ 5 pb), LR de BRCA < 3 exones y ≥ 3 exones y GIS se determinaron en muestras de ADN FFPE de cáncer. El LoD es el valor más bajo del analito que puede detectarse de forma regular (tasa de coincidencias del 95 % o un error de tipo II del 5 %). El LoD para GIS se definió como el contenido tumoral más bajo que logra una detección de GIS ≥ 95 % y para las variantes pequeñas de ADN de BRCA y las LR como la frecuencia alélica de la variante (VAF). Se utilizaron muestras de ADN FFPE de cáncer de ovario para variantes pequeñas de ADN de BRCA, GIS y LR de BRCA ≥ 3 exones. Se utilizó una muestra de ADN FFPE del cáncer de mama para LR de BRCA < 3 exones debido a la falta de disponibilidad de tejido FFPE de cáncer de ovario. Las muestras se diluyeron a varios niveles de prueba, con 12 observaciones para cada nivel de prueba por lote de reactivo por variante, generadas por varios técnicos en tres días no consecutivos utilizando dos lotes de reactivos. El mayor LoD de los dos lotes de reactivos se tomó como límite de detección de la variante ([Tabla 52](#)).

Tabla 52 Límite de detección de variantes pequeñas de ADN de BRCA, LR de BRCA, GIS

Tipo de variante	Clase de variante	C95
Variantes pequeñas de ADN de BRCA	SNV	VAF de 0,05
	Inserciones o deleciones ≥ 10 pb	VAF de 0,06
	Inserciones o deleciones < 10 pb	VAF de 0,07
	Variantes en regiones de homopolímeros ≥ 5 pb	VAF de 0,07
Reordenaciones grandes de BRCA	LR < 3 exones	VAF de 0,61
	LR ≥ 3 exones	VAF de 0,46
GIS	GIS	Contenido tumoral del 33 %

Sustancias interferentes

El impacto de posibles sustancias endógenas y exógenas en el rendimiento del ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) se evaluó con la sustancia endógena (hemoglobina) que se añadió a las muestras durante el proceso de extracción de ácidos nucleicos, así como con sustancias exógenas (etanol, proteinasa K, tampón de lavado, parafina, xileno y cebadores de índice en exceso), que se añadieron al ácido nucleico purificado antes de la preparación de genotecas. Uno o más técnicos generaron cuatro réplicas de las genotecas de muestras. Para todas las sustancias se utilizaron 10 muestras FFPE de cáncer de ovario para el análisis de variantes pequeñas de ADN de BRCA, LR de BRCA y GIS. El efecto de la necrosis también se evaluó en un conjunto diferente de tres muestras FFPE de cáncer de ovario con una gama de tejido necrótico (10 %-20 %). Para cada muestra con necrosis se incluyó un control macrodisecionado sin necrosis. Cuatro réplicas de genotecas de ADN y sus controles se procesaron juntos. Para todos los interferentes, las réplicas de muestras por sustancia se compararon con sus respectivas réplicas de control. Hemoglobina (4 mg/ml), etanol (5 %), proteinasa K (2x de la concentración representativa del método de extracción), tampón de lavado (2,5 %), parafina (25 % del tejido digerido homogeneizado), xileno (0,0001 %), cebadores de índice (30 % de exceso) no interfieren en la detección de variantes pequeñas de ADN de BRCA, LR de BRCA y GIS. Los niveles de VAF y GIS de variantes pequeñas de ADN de BRCA no se vieron afectados por la presencia de ninguno de los interferentes analizados. La presencia de tejido necrótico hasta el 20 % no interfirió con las variantes pequeñas de ADN de BRCA y GIS. No se evaluó la necrosis de las LR de BRCA debido a la falta de disponibilidad de una muestra FFPE de cáncer de ovario necrótico que albergaba una variante de LR de BRCA.

Guardbanding de valoración de entrada de ácido nucleico

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) requiere una entrada fija de 40 ng de muestra de ADN. El rendimiento del ensayo se evaluó utilizando nueve muestras de ADN extraídas de tejido FFPE ovárico para establecer tolerancias para la variación de entrada de ácido nucleico que podrían provocar el fallo del ensayo o afectar negativamente al resultado del ensayo. Cada muestra FFPE contenía una o más variantes pequeñas de ADN de

BRCA, LR de BRCA o GIS, y se analizó en cinco niveles de entrada (20 ng, 30 ng, 40 ng [nominal], 60 ng y 100 ng) por triplicado. Los resultados demostraron que la detección de variantes pequeñas de ADN de BRCA, la llamada de LR de BRCA y el estado de GIS no se vieron afectados por la diferencia en la cantidad de entrada. Los resultados también mostraron que las entradas de ácido nucleico dos veces por debajo de la condición nominal tenían un mayor número de fallos de CC, lo que llevó a menos muestras evaluadas para la llamada de variantes. En el nivel de entrada de 20 ng, se obtuvo una tasa de validez de genoteca del 55,5 % debido a fallos en el porcentaje de cobertura de exones a 50X (PCT_EXON_50X) y la mediana de cobertura de exones (MEDIAN_EXON_COVERAGE). La VAF y la GIS de variantes pequeñas de ADN de BRCA no se vieron afectadas a nivel de entrada de 20 ng.

Contaminación cruzada

El estudio de contaminación cruzada se realizó para evaluar si los resultados falsos positivos se debían a la contaminación entre pocillos durante la preparación de la genoteca de muestras o a la contaminación entre series de secuenciación consecutivas. Se realizó un análisis de las variantes pequeñas de ADN de BRCA, LR de BRCA y GIS. Las genotecas se prepararon a partir de muestras FFPE de cáncer de ovario caracterizadas en una disposición de tablero de ajedrez con muestras alternas para evaluar la contaminación de un pocillo a otro y con índices alternativos para evaluar la contaminación entre secuencias de secuenciación cuando estos se secuenciaron consecutivamente en el mismo Instrumento NextSeq 550Dx. El estudio de contaminación cruzada mostró 0,8 % acontecimientos de contaminación (2/252 acontecimientos de contaminación) observados al examinar las variantes detectadas en cada muestra. No se encontraron acontecimientos de contaminación mediante el análisis de genotecas de receptores en función de la llamada de variantes para variantes pequeñas de ADN de BRCA y LR de BRCA. Los dos acontecimientos de contaminación observados fueron positivos falsos para GIS en muestras receptoras de GIS debido a la variación intrínseca de la GIS y a que la GIS de estas dos muestras estaba cerca del umbral de decisión.

El estudio demostró que se espera que el ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) tenga una baja incidencia de contaminación cruzada entre pocillos o entre experimentos. Estos resultados, junto con las medidas de contaminación del software, mitigan el riesgo de resultados de variantes falsas debido a la contaminación de la muestra.

Evaluación del kit de extracción de ácido nucleico

Se evaluaron tres kits de extracción de ADN disponibles en el mercado con TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Los tres kits de extracción difirieron en el agente utilizado para eliminar la parafina y los pasos de unión de ácido nucleico ([Tabla 53](#)). El Kit 3 fue el kit de extracción principal usado para determinar el rendimiento de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

Se extrajo el ácido nucleico de cinco muestras ováricas FFPE (tres kits x dos técnicos x tres días x dos réplicas) para obtener ADN (36 observaciones en total). El análisis cualitativo mostró que no había diferencias perceptibles en la llamada de variantes para ninguno de los tipos de variantes (variantes pequeñas de ADN de

BRCA, LR de BRCA, GIS), ya que todas las observaciones de variantes tenían valores de PPC > 97 %. El análisis cuantitativo no mostró diferencias significativas asociadas a los kits para VAF y GIS de variantes pequeñas de ADN de BRCA.

Tabla 53 Características del kit

Kit	Nombre del kit	Agente utilizado para eliminar la parafina	Unión de ácido nucleico
1	Qiagen QIAamp DSP DNA FFPE Tissue	Xileno	Columna
2	Beckman Coulter FormaPure XL DNA	Aceite mineral	Bolas magnéticas
3	Qiagen AllPrep DNA/RNA FFPE	Solución para eliminar la parafina exclusiva	Columna

Estabilidad del reactivo

Estabilidad en tiempo real

La estabilidad en tiempo real se evaluó utilizando seis muestras de tejido de cáncer de ovario FFPE. Se analizaron tres lotes de reactivos en seis puntos temporales separados con incrementos similares (3 meses, 6 meses, 9 meses, 13 meses, 19 meses y 25 meses). Dos técnicos realizaron acontecimientos de preparación de genotecas para cada lote, incluidas tres réplicas de cada muestra, para un total de seis réplicas por lote. En el caso de las variantes de ADN pequeñas de BRCA de regiones de interés, la PPC agregada fue del 100 %, en el caso de la PPC agregada de LR de BRCA de regiones de interés fue ≥ 92 % y en el caso de la PPC agregada de GIS fue ≥ 83 %. Además, no hubo diferencias significativas asociadas al tiempo para la VAF de las variantes pequeñas de ADN de BRCA o GIS.

Estabilidad en uso del kit

La estabilidad en uso del kit para ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) se evaluó en condiciones de uso normales durante el periodo de validez del producto para que el kit pueda usarse varias veces. Los componentes congelados del kit de reactivos se sometieron a múltiples ciclos de congelación y descongelación, y los reactivos refrigerados se llevaron a temperatura ambiente y se evaluaron para permitir hasta cuatro usos del kit. Se cumplieron todos los criterios de control de calidad para todos los ciclos de congelación-descongelación y todos los puntos temporales analizados. Se evaluó la llamada de variantes para detectar variantes pequeñas de ADN de BRCA, LR de BRCA y GIS. Los resultados admiten hasta cuatro ciclos de congelación-descongelación del kit. Además, se utilizó un kit de reactivos para preparar un total de 24 muestras de ADN por técnico, lo que demuestra que hay suficiente volumen de reactivos para 24 genotecas de ADN y 24 de HRD.

Estabilidad del transporte

La estabilidad del transporte del kit del ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) se evaluó utilizando nueve muestras FFPE de cáncer de ovario para mostrar la funcionalidad de los kits de reactivos de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) después de la exposición a condiciones de distribución simuladas. Se utilizaron ocho muestras FFPE de cáncer de ovario para mostrar la funcionalidad después de la exposición del kit de reactivos a perfiles de temperatura internacionales simulados de verano e invierno. Las pruebas funcionales se realizaron después de la exposición con las muestras mencionadas anteriormente y consistieron en de 6 a 12 réplicas de cada muestra por condición. También se observaron los atributos físicos de los kits y se descubrió que se mantenían después de la distribución para todos los casos de prueba. Las pruebas funcionales concluyeron que el envío no afectó negativamente a la llamada de variantes para variantes pequeñas de ADN de BRCA (PPC $\geq 96\%$), LR de BRCA (PPC $\geq 94\%$) y GIS (PPC = 100 %), en relación con la condición de control.

Estabilidad de la muestra

Estabilidad del ácido nucleico

La estabilidad de los ácidos nucleicos (ADN) y su cuantificación asociada para su uso con el ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) se evaluaron utilizando muestras de tejido FFPE de cáncer de ovario. Los bloques FFPE se seccionaron y se extrajo ADN. El ácido nucleico extraído se mezcló bien, se cuantificó, se comprobó la calidad del ácido nucleico y se dividió en dos juegos de tubos de un solo uso para congelar durante dos puntos temporales: T0 (control) y T1 (para 28 días). Todo el ADN extraído se almacenó entre -25°C y -15°C hasta que se analizó a T0 o T1 con múltiples réplicas y técnicos. La T1 se comparó con la T0 para variantes pequeñas de ADN de BRCA, LR de BRCA y GIS. Los datos indican que los ácidos nucleicos y su cuantificación asociada para su uso con el ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) son estables durante un máximo de 28 días cuando se almacenan a las temperaturas recomendadas (entre -25°C a -15°C).

Estabilidad de las genotecas

La estabilidad de las genotecas que utilizan cada uno de los cinco puntos de detención de seguridad para el ensayo (consulte la [Tabla 54](#)) se evaluó utilizando múltiples muestras de tejido FFPE de cáncer de ovario y una muestra de tejido FFPE de cáncer de mama. Las genotecas de control (T0, sin puntos de detención) se secuenciaron inmediatamente al final del flujo de trabajo. Las alícuotas de las mismas genotecas se mantuvieron en los puntos de detención entre -25°C y -15°C durante el tiempo (T1) correspondiente a los días indicados en la [Tabla 54](#). La T1 se comparó con la T0 para variantes pequeñas de ADN de BRCA, LR de BRCA y GIS. Los datos indican que las genotecas generadas a partir del ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) son estables de acuerdo con las instrucciones de uso.

Tabla 54 Tiempos de almacenamiento de genotecas

Tipo de genoteca	Placa	Número de días
ADNg fragmentado	PCR de LP	≤ 7

Tipo de genoteca	Placa	Número de días
Enriquecimiento previo	PCR de ALS	≤30
Enriquecimiento posterior	PCR de ELU2	≤7
PCR de enriquecimiento posterior	PCR de PL	≤30
Normalizada	PCR de NL	≤32

Estabilidad de tejido FFPE montado en un portaobjetos

La estabilidad del tejido FFPE montado en un portaobjetos para su uso con el ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) se evaluó seccionando bloques FFPE (secciones de 5 µm) de diez muestras de tejido FFPE de cáncer de ovario, montadas en portaobjetos, y a continuación almacenadas a temperatura ambiente (22 °C) durante dos puntos temporales: T0 (control) y T1 (para 28 días). El material de ácido nucleico se cuantificó y a continuación se procesó a través del ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) en un plazo de 24 horas para cada punto temporal. En cada punto temporal, varios técnicos analizaron varias réplicas por muestra. La T1 se comparó con la T0 para variantes pequeñas de ADN de BRCA, LR de BRCA y GIS. Se evaluó la llamada de variantes. Los datos indican que el tejido FFPE montado en portaobjetos para su uso con TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) es estable a temperatura ambiente durante un máximo de 28 días.

Estudio puente de rendimiento clínico de HRD

Para validar el ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) como CDx para la selección de pacientes con cáncer de ovario para el tratamiento con LYNPARZA (olaparib), se analizaron muestras residuales de pacientes inscritas en el ensayo clínico PAOLA-1 (NCT02477644) para respaldar un estudio puente clínico.

El estudio se llevó a cabo para evaluar la concordancia del estado de HRD entre el ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) y el ensayo clínico (CTA, clinical trial assay) utilizado en PAOLA-1, y para evaluar la eficacia clínica de olaparib en las pacientes positivas para HRD identificadas por el ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). PAOLA-1 fue un estudio multicéntrico, de fase III, aleatorizado, con doble enmascaramiento y controlado con placebo para investigar la eficacia clínica de olaparib más bevacizumab como tratamiento de mantenimiento de primera línea para pacientes con cáncer de ovario avanzado. El estado de HRD de los pacientes se determinó después de la aleatorización y antes del análisis principal, utilizando el CTA. El criterio principal de valoración fue la supervivencia libre de progresión (SLP), definida como el tiempo transcurrido desde la aleatorización hasta la progresión, determinada por la evaluación del investigador utilizando los criterios RECIST 1.1 modificados o la muerte. De las 806 pacientes aleatorizadas en el estudio PAOLA-1, 399 muestras residuales estaban disponibles para su análisis con TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Los datos demográficos de los sujetos con resultados de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) disponibles fueron similares a los del estudio PAOLA-1. Del mismo modo, las características de las participantes fueron, por lo general, similares entre las que eran positivas para HRD con TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) frente a las que eran positivas para HRD mediante el CTA.

Resultados de concordancia

De las 399 muestras disponibles para su análisis con TSO Comprehensive HRD (DRAGEN), 382 obtuvieron un resultado evaluable. Las 17 muestras no evaluables no produjeron un resultado debido a fallos en el control de calidad de la prueba (N = 12) o la revisión patológica (N = 5) (tasa de resultados no válidos del ensayo del 3 % [12/394]). Un total de 365 pacientes inscritas tenían muestras con resultados evaluables tanto del CTA como de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). La coincidencia de los resultados de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) en relación con los resultados del CTA entre las muestras con resultados válidos se muestra en la [Tabla 55](#).

Tabla 55 Concordancia entre TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) y el CTA para la detección de HRD

		Resultado del CTA		
		Positivo para HRD	Negativo para HRD	Total
Resultado del ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)	Positivo para HRD	204	12	216
	Negativo para HRD	5	144	149
	Total	209	156	365
Estadísticas de coincidencia	% de PPA (n/N; IC* del 95 %)	97,6 % (204/209; 94,5 %, 99,2 %)		
	% de NPA (n/N; IC* del 95 %)	92,3 % (144/156; 86,9 %, 96,0 %)		
	% de OPA (n/N; IC* del 95 %)	95,3 % (348/365; 92,6 %, 97,3 %)		

* IC basado en el método binomial exacto (Clopper and Pearson, 1934).

Resultados de eficacia clínica

El rendimiento clínico de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) se estableció mediante la determinación de la eficacia clínica en la población positiva para HRD. Los cocientes de riesgo (HR) de la SLP (supervivencia libre de progresión) para los grupos de tratamiento con olaparib frente a placebo se calcularon utilizando un modelo no ajustado de riesgos proporcionales de Cox. La [Tabla 56](#) muestra los cocientes de riesgo de SLP en el CTA y en las participantes positivas para TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) HRD. La [Figura 4](#) muestra las curvas de Kaplan-Meier para la SLP en las participantes positivas para TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). En las poblaciones del CTA y positivas para TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) HRD, el cociente de riesgo de la SLP fue de 0,33 (IC del 95 %: 0,25, 0,45) y 0,32 (IC del 95 %: 0,22, 0,48), respectivamente, y representó una reducción del 67 % y el 68 % en el riesgo de progresión o muerte para las participantes del grupo de olaparib más bevacizumab en comparación con el grupo de placebo más bevacizumab. Un análisis de sensibilidad que abordó la eficacia de los resultados de CDx ausentes imputados demostró que los cocientes de riesgo de SLP en las poblaciones positivas para HRD imputadas eran coherentes con las estimaciones del análisis principal.

Tabla 56 Eficacia clínica en el CTA y el ensayo de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)

		Positivo para HRD	
		Olaparib +bev	Placebo +bev
CTA	N	225	132
	SLP ¹ (IC del 95 %) ²	37,2 (36,0, NR ⁴)	17,7 (15,8, 19,9)
	HR de la SLP (IC del 95 %) ³	0,33 (0,25, 0,45)	
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)	N	149	71
	SLP ¹ (IC del 95 %) ²	NR ⁴ (37,2, NR ⁴)	17,4 (14,7, 22,1)
	HR de la SLP (IC del 95 %) ³	0,32 (0,22, 0,48)	

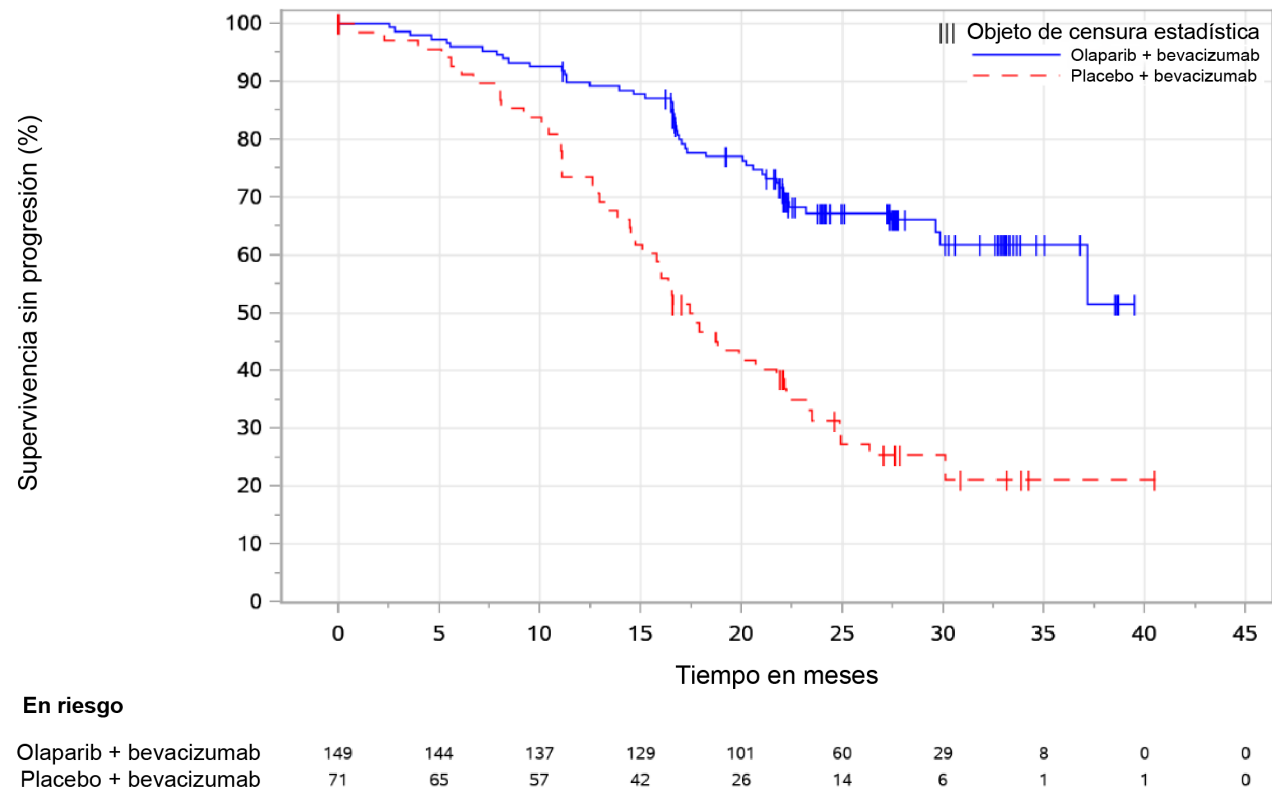
¹ Mediana de SLP en meses.

² Del método de límite del producto (Kaplan-Meier) para los datos censurados estadísticamente.

³ Basado en un modelo de regresión de Cox no estratificado con el tratamiento como covariable.

⁴ NR = No alcanzado

Figura 4 Curva de Kaplan-Meier: SLP en participantes positivas para HRD identificadas mediante TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)



Referencias bibliográficas

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(1):7-33. doi:10.3322/caac.21654
2. Shih I-M, Wang Y, Wang T-L. The Origin of Ovarian Cancer Species and Precancerous Landscape. *Am J Pathol.* 2021;191(1):26-39. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.09.006
3. Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P, et al. Statement by the Kommission Ovar of the AGO: The New FIGO and WHO Classifications of Ovarian, Fallopian Tube and Primary Peritoneal Cancer. Stellungnahme der Organkommission Ovar der AGO: die neuen FIGO- und WHO-Klassifikationen des Ovarial-, Tuben- und primären Peritonealkarzinoms. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2015;75(10):1021-1027. doi: 10.1055/s-0035-1558079
4. Bell D, Berchuck A, Birrer M, et al. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nat.* 2011;474(7353):609-615. doi: 10.1038/nature10166
5. Pennington KP, Walsh T, Harrell MI, et al. Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2014;20(3):764-775. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2287
6. Coleman RL, Oza AM, Lorusso D, et al. Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2017;390(10106):1949-1961. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32440-6
7. González-Martín A, Pothuri B, Vergote I, et al. Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(25):2391-2402. doi: 10.1056/NEJMoa1910962
8. Ledermann J, Harter P, Gourley C, et al. Olaparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive Relapsed Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(15):1382-1392. doi: 10.1056/NEJMoa1105535
9. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, et al. Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(22):2154-2164. doi: 10.1056/NEJMoa1611310
10. Moore K, Colombo N, Scambia G, et al. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(26):2495-2505. doi: 10.1056/NEJMoa1810858
11. Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, et al. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(9):1274-1284. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30469-2
12. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, et al. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(25):2416-2428. doi: 10.1056/NEJMoa1911361
13. Norquist BM, Brady MF, Harrell MI, et al. Mutations in Homologous Recombination Genes and Outcomes in Ovarian Carcinoma Patients in GOG 218: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study. *Clin Cancer Res.* 2018;24(4):777. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1327
14. Bolton KL, Chenevix-Trench G, Goh C, et al. Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *JAMA.* 2012;307(4):382-390. doi: 10.1001/jama.2012.20

15. Moore KN, Secord AA, Geller MA, et al. Niraparib monotherapy for late-line treatment of ovarian cancer (QUADRA): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2019;20(5):636-648. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30029-4
16. Lynparza (Olaparib) Prescribing Information. *U.S. Food and Drug Administration* (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/208558s013lbl.pdf). Publicado en 2014. Actualizado en octubre de 2023. Fecha de consulta: 7 de marzo de 2025.
17. Kanchi KL, Johnson KJ, Lu C, et al. Integrated analysis of germline and somatic variants in ovarian cancer. *Nat Commun.* 2014;5:3156-3156. doi: 10.1038/ncomms4156
18. Swisher EM, Lin KK, Oza AM, et al. Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(1):75-87. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30559-9

Historial de revisiones

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de documento 200080934 v00	Mayo de 2026	Publicación inicial.

Patentes y marcas comerciales

Este documento y su contenido son propiedad exclusiva de Illumina, Inc. y sus empresas vinculadas ("Illumina"), y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes en relación con el uso de los productos descritos en él y no para ningún otro fin. Este documento y su contenido no se utilizarán ni distribuirán con ningún otro fin ni tampoco se comunicarán, divulgarán ni reproducirán de ninguna otra forma sin el consentimiento previo por escrito de Illumina. Illumina no transfiere mediante este documento ninguna licencia bajo sus derechos de patente, marca comercial, autor ni consuetudinarios o derechos similares de terceros.

Para garantizar el uso correcto y seguro de los productos descritos en este documento, el personal cualificado y adecuadamente capacitado debe seguir las instrucciones incluidas en él de manera rigurosa y expresa. Se debe leer y entender por completo todo el contenido de este documento antes de usar estos productos.

SI NO SE LEE COMPLETAMENTE EL DOCUMENTO Y NO SE SIGUEN EXPRESAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES DESCRITAS EN ESTE, PODRÍAN PRODUCIRSE DAÑOS EN EL PRODUCTO, LESIONES PERSONALES (TANTO EN LOS USUARIOS COMO EN OTRAS PERSONAS) Y DAÑOS EN OTROS BIENES, Y QUEDARÁ ANULADA TODA GARANTÍA APLICABLE AL PRODUCTO.

ILLUMINA NO ASUME RESPONSABILIDAD ALGUNA DERIVADA DEL USO INCORRECTO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (LO QUE INCLUYE LAS PIEZAS O EL SOFTWARE).

© 2026 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea obtener información concreta sobre las marcas comerciales, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

Información de contacto



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 (EE. UU.)
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (fuera de Norteamérica)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE
2797



Etiquetado de productos

Para obtener información detallada sobre los símbolos que aparecen en las etiquetas o en el embalaje del producto, consulte la leyenda que se ofrece en support.illumina.com en la ficha *Documentation* (Documentación) del kit.

Encontrará un resumen de la seguridad y el rendimiento (SSP) en <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, tras el lanzamiento de la Base de Datos Europea sobre Productos Sanitarios (Eudamed), que está vinculada al sistema Basic UDI-DI (0081627002TSOHRDDGRK).