



# Plasma-SeqSensei™













## Breast Cancer IVD Kit

Instrucciones de uso

Diciembre 2023

ZR150547.R3

## PRUEBA IN VITRO/Para diagnóstico in vitro

Leyenda de símbolos			
	Fabricante		Fecha de caducidad
	Número de catálogo		Número de lote
	Contiene suficiente para <n> pruebas		Precaución
	Límite de temperatura		Consúltense las instrucciones de uso
	Diagnóstico in vitro		No reutilizar
	Manténgase alejado de la luz		Manténgase seco
	Límite de humedad		

## Tabla de contenidos

<b>1</b>	<b>Propósito previsto</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Introducción</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Principio de prueba</b>	<b>5</b>
<b>4</b>	<b>Áreas cubiertas</b>	<b>7</b>
<b>5</b>	<b>Interpretación de los resultados variantes</b>	<b>8</b>
<b>6</b>	<b>Limitaciones</b>	<b>9</b>
<b>7</b>	<b>Reactivos, consumibles y equipos</b>	<b>10</b>
7.1	Material proporcionado	11
7.2	Material no proporcionado	13
7.3	Consumibles	14
7.4	Equipos	14
<b>8</b>	<b>Almacenamiento y manipulación</b>	<b>16</b>
8.1	Condiciones de envío	16
8.2	Precauciones de manipulación generales	16
8.3	Advertencias y precauciones	16
8.3.1	Medidas específicas	17
8.3.2	Manipulación y almacenamiento	17
8.3.3	Precauciones de manipulación de reactivos	18
8.3.4	Precauciones de seguridad y contaminación	18
<b>9</b>	<b>Procedimiento</b>	<b>21</b>
9.1	PCR UID (PCR Multiplex)	22
9.2	Purificación de PCR UID	27
9.3	PCR Index	31
9.4	Purificación de PCR Index	36
9.5	CC de la librería (Bioanalyzer)	40
9.6	Secuenciación de NextSeq™ 500/550 de Illumina	44
<b>10</b>	<b>Asistencia técnica</b>	<b>48</b>
<b>11</b>	<b>Características de funcionamiento</b>	<b>49</b>
11.1	Sensibilidad analítica	49
11.2	Especificidad analítica	49
11.3	Precisión/repetibilidad	49
11.4	Rango de medición/linealidad	50
11.5	Sustancias que interfieren	50
11.6	Resultado clínico y características	50
11.7	Limitaciones	51
<b>12</b>	<b>Glosario y terminología</b>	<b>52</b>
<b>13</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>54</b>
<b>14</b>	<b>Copyrights y marcas comerciales</b>	<b>55</b>
<b>15</b>	<b>Historial de revisiones</b>	<b>56</b>

### 1 Propósito previsto

Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit es un ensayo cuantitativo para secuenciación de última generación (Next-Generation Sequencing, NGS) diseñado para la detección e identificación de mutaciones en los genes diana AKT1, ERBB2, ESR1, KRAS, PIK3CA y TP53 en el ADN libre circulante (cfDNA) aislado del plasma sanguíneo de pacientes con cáncer de mama para detectar la enfermedad mínima residual, la vigilancia de recaídas y el seguimiento de la respuesta (neo)adyuvante en pacientes.

Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit solo debe utilizarse junto con el software de Plasma-SeqSensei™ IVD para lograr su uso previsto y debe llevarlo a cabo personal formado en un entorno de laboratorio profesional. La información generada nunca debe ser el único factor determinante para tomar decisiones médicas.

**Nota:** *Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit no está diseñado para utilizarse en el cribado, para el diagnóstico de cáncer o como diagnóstico complementario (Companion Diagnostics).*

## 2 Introducción

El cáncer de mama es el cáncer más diagnosticado y la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres de todo el mundo (1). En los últimos años, se ha llevado a cabo una amplia investigación sobre la cirugía curativa, la terapia (neo)adyuvante y la terapia dirigida, lo que ha permitido aumentar la tasa de supervivencia (2).

Las células tumorales que sufren apoptosis, necrosis o secreción metabólica liberan pequeñas cantidades de su ADN en el flujo sanguíneo. La fracción de cfDNA específica del tumor también se denomina ADN tumoral circulante (ctDNA) y contiene la información genética característica del tumor primario e incluso de la metástasis. Un gran número de estudios de investigación y ensayos han demostrado las aplicaciones clínicas de los perfiles de ctDNA en diferentes etapas del tratamiento del cáncer, incluida la selección de la terapia, el pronóstico y el seguimiento (3).

Para la detección del ctDNA existen varias tecnologías basadas en la NGS. Sin embargo, debido a los sesgos/errores de secuenciación y PCR, la mayoría de ellas no son adecuadas para la detección de variantes raras. Plasma-SeqSensei™ es una novedosa tecnología basada en NGS que implementa identificadores moleculares únicos (Unique Molecular Identifier, UID) en el procedimiento de secuenciación. Esto resulta en una significativa reducción del ruido de fondo, lo que lleva a una sensibilidad ultra alta de la tecnología Plasma-SeqSensei™ (4).

### 3 Principio de prueba

Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit detecta las mutaciones genéticas en el ctDNA aislado del plasma sanguíneo. Para aumentar la sensibilidad del método, los fragmentos de ADN se etiquetan con UIDs durante el primer paso de amplificación. Esto da lugar a la formación de familias de UID que consisten en varias copias de cada UID asignado. Durante el segundo paso de amplificación, a cada miembro de una familia de UID se le asigna además un código de identificadores específico del pocillo y de la placa (4). Por motivos de validez, se incluye un control de entrada de cuantificación interno (Quantispikes) además de los controles positivos y negativos externos en cada análisis.

El procedimiento incluye el análisis de datos automatizado y la generación de informes mediante el software Plasma-SeqSensei™ IVD. El software cuantifica el cfDNA de partida e identifica supermutantes, que son familias de UID en los que al menos el 90 % de todos los fragmentos de PCR contienen mutaciones idénticas. Este concepto permite distinguir los mutantes reales de los elementos de PCR o de secuenciación presentes en un número muy bajo dentro de una familia de UID. El proceso principal de la tecnología Plasma-SeqSensei™ se muestra en la Figura 1.

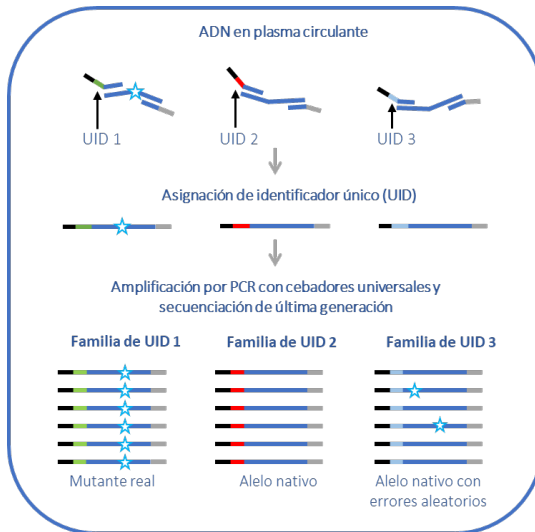


Figura 1: Principio de la tecnología Plasma-SeqSensei™

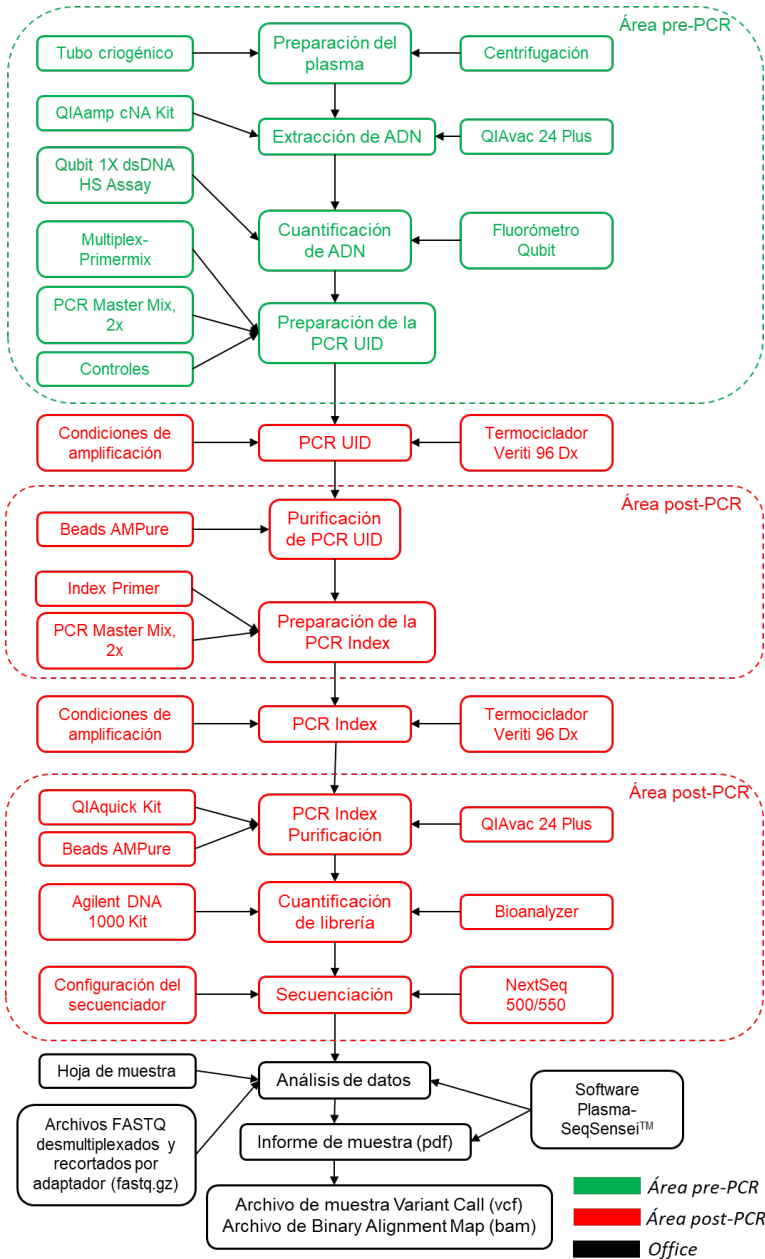


Figura 2: Resumen del procedimiento del método Plasma-SeqSensei™

## 4 Áreas cubiertas

**Tabla 1: Áreas cubiertas con Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit**

Gen	Transcripción*	Inicio de la secuencia de codificación	Fin de la secuencia de codificación	Inicio amino-acídico	Final amino-acídico
AKT1	ENST00000554581.1	47	69	17	23
ERBB2	ENST00000269571.5	907	947	303	315
ERBB2	ENST00000269571.5	2.258	2.307	754	769
ERBB2	ENST00000269571.5	2.308	2.360	770	786
ESR1	ENST00000440973.1	1.108	1.143	370	381
ESR1	ENST00000440973.1	1.378	1.420	460	473
ESR1	ENST00000440973.1	1.583	1.614	529	538
KRAS	ENST00000256078.4	8	43	4	14
PIK3CA	ENST00000263967.3	254	278	86	92
PIK3CA	ENST00000263967.3	329	352	111	117
PIK3CA	ENST00000263967.3	353	367	119	122
PIK3CA	ENST00000263967.3	1.033	1.058	345	352
PIK3CA	ENST00000263967.3	1.085	1.115	363	371
PIK3CA	ENST00000263967.3	1.252	1.264	418	421
PIK3CA	ENST00000263967.3	1.348	1.387	450	462
PIK3CA	ENST00000263967.3	1.611	1.659	538	553
PIK3CA	ENST00000263967.3	2.138	2.184	714	728
PIK3CA	ENST00000263967.3	3.118	3.169	1.040	1.056
TP53	ENST00000269305.4	144	232	49	77
TP53	ENST00000269305.4	293	375	99	125
TP53	ENST00000269305.4	376	423	126	141
TP53	ENST00000269305.4	451	537	151	179
TP53	ENST00000269305.4	574	659	192	219
TP53	ENST00000269305.4	695	782	233	260
TP53	ENST00000269305.4	783	856	262	285
TP53	ENST00000269305.4	888	919	297	306
TP53	ENST00000269305.4	920	993	308	331
TP53	ENST00000269305.4	994	1.080	332	360

\* Fuente de secuencia: Base de datos del conjunto



### 5 Interpretación de los resultados variantes

El ensayo está diseñado para detectar mutaciones somáticas en el ctDNA proveniente del plasma. Los resultados de esta prueba pueden servir como complemento al trabajo del médico que la solicita y, como tal, debe interpretarlos un profesional sanitario cualificado en el contexto de los resultados clínicos, la patología del tumor y otros datos de laboratorio.

#### Frecuencia de mutaciones:

La frecuencia de las mutaciones se presenta como MAF (fracción alélica mutada) y como número absoluto de MM (moléculas mutantes). La MAF es la proporción de ctDNA mutante en relación con el cfDNA total. La MAF puede utilizarse para confirmar la presencia o ausencia de mutaciones. Sin embargo, puede no reflejar la carga tumoral total, ya que la proporción de ctDNA en relación con el cfDNA total en una muestra puede verse afectada por diversos factores, como la localización anatómica del tumor, la renovación celular del tumor, la vascularización, el tratamiento, los procedimientos de toma de muestras de sangre, la manipulación de las muestras y las características clínicas del paciente no relacionadas con el estado del tumor (5). El número absoluto de MM detectado para una determinada variante representa el número total de moléculas detectadas en una muestra y puede proporcionar una visión directa de las características de la biología del tumor únicas para cada paciente (5)(6).

#### Variantes indicadas:

Se reportan las variantes con impacto funcional caracterizado, probable o previsto. Estas se basan en bases de datos públicas como COSMIC (7) o se indican en la literatura científica revisada por expertos (6)(8)(9). Además, las variantes del presunto origen de la línea germinal, indicadas por una MAF observada entre el 40 % y el 60 % o una MAF observada superior al 90 %, se muestran en una tabla independiente en el informe.

### 6 Limitaciones

Las presuntas mutaciones de la línea germinal se excluyen de los informes sobre mutaciones somáticas en función de los valores de MAF observados. Sin embargo, se incluyen en una tabla independiente y se marcan como posibles mutaciones de la línea germinal, ya que esta prueba no puede determinar definitivamente si estas mutaciones son de origen germinal sin el análisis de células sanas compatibles.

Además, las mutaciones indicadas para ciertos genes en un pequeño subgrupo de pacientes pueden ser el resultado de la hematopoyesis clonal y deben adjudicarse mediante el análisis de células sanguíneas comparables.

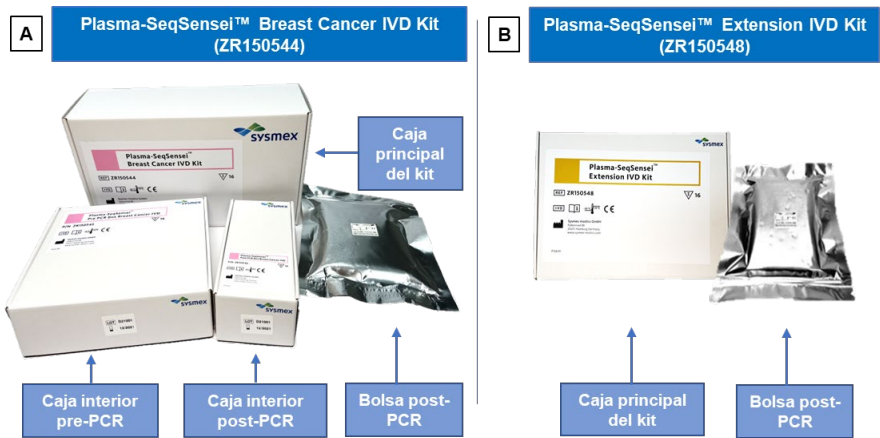
La detección del ctDNA depende de varios factores, como la carga tumoral, la biología del tumor, las condiciones de recogida de la muestra, el carácter heterogéneo del muestreo y las características clínicas. Se ha demostrado que la prueba presenta variaciones bajas pero detectables en función del contexto de la secuencia, especialmente en muestras con recuentos de moléculas diana en torno al punto de corte.

Esta prueba detecta cambios de nucleótidos, y los consecuentes cambios en aminoácidos se describen en el informe. En el caso de los codones codificadores de aminoácidos que solo están parcialmente cubiertos (bordes de amplicón), la anotación de aminoácidos en el informe se realiza basándose en la suposición de que las bases que no están cubiertas por el ensayo se corresponden con las de la secuencia de referencia.

Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit ha sido probado para detectar los siguientes tipos de mutaciones somáticas: variaciones de nucleótido único (Single-Nucleotide Variation, SNVs), inserciones (hasta 27 nucleótidos), deleciones (hasta 48 nucleótidos) y variantes de deleción/inserción (hasta 17 nucleótidos).

## 7 Reactivos, consumibles y equipos

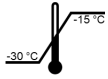
Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit contiene dos cajas interiores y una bolsa. Una caja debe almacenarse en el laboratorio de pre-PCR y la otra caja, así como la bolsa que contiene la placa Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate, deben almacenarse en el laboratorio de post-PCR. Se recomienda encarecidamente dividir la caja del kit a su llegada en dos laboratorios independientes para minimizar el riesgo de contaminación de los reactivos. La caja pre-PCR está diseñada para manipularse en un laboratorio donde no se manipula ADN amplificado. La caja post-PCR y la bolsa están diseñadas para manipularse en un laboratorio donde se abren y manipulan viales/placas de reacciones de PCR.



**Figura 3:** Se muestran las cajas de Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit con la bolsa (A) y la caja y la bolsa de Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit (B) con sus respectivas ubicaciones de almacenamiento (áreas pre/post-PCR).

7.1 Material proporcionado

El material proporcionado es fundamental para el ensayo y no puede sustituirse por otros productos.



Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit debe almacenarse a una temperatura entre -15 °C y -30 °C cuando no se utilice.

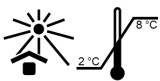


Una vez abierto los reactivos son estable durante 30 días o hasta alcanzar la fecha de caducidad, lo que ocurra primero (excepto el agua).

**Tabla 2: Material proporcionado con Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit (ZR150544)**

Caja	Nombre * (color del tapón)	Nº cat.	Tubos	Ciclos de congelación y descongelación	Temperatura de almacenamiento
Caja pre-PCR	Breast Cancer Mpx A (azul)	ZR851013	4	2	De -15 °C a -30 °C
	Breast Cancer Mpx B (amarillo)	ZR851014	4	2	De -15 °C a -30 °C
	Breast Cancer Positive Control (rojo)	ZR855006	4	2	De -15 °C a -30 °C
	No Template Control (transparente)	ZR854002	4	2	De -15 °C a -30 °C
	Quantispike (verde)	ZR856001	4	2	De -15 °C a -30 °C
	PCR Master Mix v2, 2x (negro)	ZR850001	4	4	De -15 °C a -30 °C
Bolsa post-PCR	Index Primer Plate IND34 <sup>1,2</sup>	ZR852004	1	N/A	De -15 °C a -30 °C
Caja post-PCR	PCR Master Mix v2, 2x (negro)	ZR850001	2	4	De -15 °C a -30 °C
	Water, nuclease-free (transparente/blanco)	ZR224006	1	N/A	De -15 °C a -30 °C

\* Los nombres pueden variar debido a la adición de PSS antes del nombre, según el lote del kit.



<sup>1</sup> Proteja las placas de la exposición lumínica. Después de su primer uso, almacene la placa Index Primer Plate a una temperatura entre 2 °C y 8 °C.

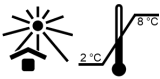
<sup>2</sup> La placa Index Primer Plate IND34 también se denomina placa A en el procedimiento y en el software de Plasma-SeqSensei™ IVD.

En el caso de que se analicen más de 16 muestras en la misma carrera de secuenciación, se debe pedir un Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit.

**Tabla 3: Material proporcionado con Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit (ZR150548)**

Caja	Nombre * (color del tapón)	Nº cat.	Tubos	Ciclos de congelación y descongelación	Temperatura de almacenamiento
Bolsa post-PCR	Index Primer Plate IND35 <sup>1,2</sup>	ZR852005	1	N/A	De -15 °C a -30 °C

\* Los nombres pueden variar debido a la adición de PSS antes del nombre, según el lote del kit.



<sup>1</sup> Proteja las placas de la exposición lumínica. Después de su primer uso, almacene la placa Index Primer Plate a una temperatura entre 2 °C y 8 °C.

<sup>2</sup> La placa Index Primer Plate IND35 también se denomina placa B en el procedimiento y en el software de Plasma-SeqSensei™ IVD

**Tabla 4: Composición del material proporcionado**

Nombre	Composición
Breast Cancer Mpx A	Primer Tris EDTA Buffer
Breast Cancer Mpx B	Primer Tris EDTA Buffer
Breast Cancer Positive Control	Double-stranded synthetic DNA wild-type/mutant Tris EDTA Buffer Carrier RNA
No Template Control	Tris EDTA Buffer
Quantispike	Double-stranded synthetic DNA Tris EDTA Buffer Carrier RNA
Index Primer Plate	Index primers (well-specific) Bromophenol blue
PCR Master Mix v2, 2x	Hot-Start Polymerase PCR Buffer dNTPs
Water, nuclease-free	Nuclease-free water, molecular biology grade



Todos los componentes líquidos y secos del kit son de un solo uso. Cada pocillo de la placa Index Primer Plate es de un solo uso.

Los tubos que contienen reactivos son reactivos de uso múltiple, ya que pueden descongelarse y congelarse según la Tabla 2 para extraer líquido en los pasos indicados del procedimiento.

## 7.2 Material no proporcionado

Los productos, cuya información sobre el fabricante/proveedor y el número de pedido se indican en la Tabla 5, Tabla 6, y Tabla 7, son fundamentales para el ensayo y no deben intercambiarse por productos de calidad o propiedades similares.

**Tabla 5: Material no proporcionado con Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit**

Material	Producto
Reactivos y kits	Etanol (EtOH) ≥99,8 %, para análisis
	RNase- and DNase free distilled water
	* Agencourt® AMPure® XP, Beckman Coulter, n° A63881
	* Buffer EB (tampón de elución), QIAGEN, n° 19086
	* QIAquick® PCR Purification Kit, QIAGEN, n° 28104 o n° 28106
	* Buffer PB, QIAGEN, n° 19066
	* DNA 1000 Kit, Agilent, n° 5067-1504 <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Chips de microfluidos</li> <li>■ Reactivos</li> </ul>
	* Kit de ensayo Qubit™ 1X dsDNA HS, Thermo Fisher, n° Q33230 (100 rxns) o n° Q33231 (500 rxns)
	Hidróxido de sodio (NaOH), 1 M
	Solución de hidrócloruro Trizma® pH 7,0, 1 M
	* NextSeq™ 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 ciclos), Illumina, n° 20024904 Partes del kit: <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Cartucho de reactivo Mid Output (150 ciclos), n° 15057940</li> <li>■ Cartucho de celda de flujo Mid Output, n° 20022409</li> <li>■ Cartucho del tampón, n° 15057941</li> <li>■ Tampón de hibridación (HT1), n° 15058251</li> </ul>
	* NextSeq™ 500/550 High Output Kit v2.5 (150 ciclos), Illumina, n° 20024907 Partes del kit: <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Cartucho de reactivo High Output (150 ciclos), n° 15057931</li> <li>■ Cartucho de célula de flujo High Output, n° 20022408</li> <li>■ Cartucho del tampón, n° 15057941</li> <li>■ Tampón de hibridación (HT1), n° 15058251</li> </ul>

\* Componentes fundamentales; no deben intercambiarse por productos de calidad o propiedades similares.

### 7.3 Consumibles

**Tabla 6: Consumibles necesarios para Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit**

Equipamiento de laboratorio	Producto
Puntas de pipeta/pipetas serológicas	Puntas de pipeta estériles resistentes a aerosoles con filtros de 2, 10, 20, 200, 1.000 µl
Tubos de reacción	Tubos de 15, 5, 2 y 1,5 ml
	* Tubos de ADN LoBind® de 1,5 ml, Eppendorf, n° 0030108051
	* Tubos de ensayo Qubit™, Thermo Fisher, n° Q32856
	Tiras de tubos con tapones (1,3 ml)
Placas de 96 pocillos	* Placa PCR, de 96 pocillos, segmentada, con semifaldón, Thermo Scientific, n° AB0900 o n° AB2400 (necesaria para PCR)
	Placa PCR Multiply® de 96 pocillos sin faldón lateral, Sarstedt (opcional, para diluciones)
Lámina de sellado para placas de 96 pocillos	Lámina de aluminio
	Film adhesivo transparente
Equipo de seguridad	Batas, mangas, gafas, fundas desechables para zapatos y guantes protectores
Varios	Reservorios de reactivos desechables (25 ml)
	* Tubos de extensión de 3 ml para bombas de vacío QIAvac, QIAGEN, n° 19587
	* VacConnectors (500) para bombas de vacío QIAvac, QIAGEN, n° 19407

\* Componentes fundamentales; no deben intercambiarse por productos de calidad o propiedades similares.

### 7.4 Equipos

**Tabla 7: Equipos necesarios para Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit**

Equipamiento de laboratorio	Producto
Instrumentos electrónicos	Centrífuga para tubos de 1,5/2 ml, capaz de alcanzar 20.000×g, rotor de ángulo fijo
	Centrífuga para tubos de 15/50 ml, capaz de alcanzar 7.197×g, rotor de ángulo fijo

## 7 Reactivos, consumibles y equipos

Equipamiento de laboratorio	Producto
	Centrífuga para placas de 96 pocillos, capaz de alcanzar 1.000×g, rotor de ángulo fijo
	Minicentrífuga, capaz de alcanzar ≤2.000×g
	Vortexer con inserciones para tubos y placas de 96 pocillos
	Vortexer con inserción para chips de ADN Agilent, capaz de alcanzar 2.400 rpm
	Congelador, de -15 °C a -30 °C
	Refrigerador, de 2 °C a 8 °C
	Estación de trabajo para ADN/cabina para PCR
	Campana de gases (muy aconsejable)
	Cabinas de seguridad biológica de clase II (muy aconsejables)
	QIAGEN Connecting System
	QIAvac 24 Plus System
	Bomba de vacío (230 V, 50 Hz)
	Termociclador de 96 pocillos Veriti Dx o equivalente*
	Agilent 2100 Bioanalyzer System
	Chip Priming Station, Agilent, n° 5065-4401
	Illumina NextSeq™ 500/550
	2100 Expert Software, Agilent Technologies
Pipetas	Pipeta de 1.000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl, 2 µl
	Pipeta multicanal de 8 o 12 canales de 200 µl, 20 µl
	Pipeteador de 5 a 100 ml
Gradillas	Gradilla para tubos de 50 ml, 15 ml, 5 ml, 1,5/2 ml
	Gradilla para tiras de tubos
	Gradilla de 96 pocillos
	Placa magnética 96S Super de Alpaqua®, unidad de mantenimiento de existencias: A001322
	Imán DynaMag™-2, Thermo Fisher, n° 12321D
	Cajas de almacenamiento para congelador
Varios	Aplicador de láminas adhesivas
	Cronómetro

\* El equivalente y el uso de otros dispositivos termocicladores se realiza por cuenta y riesgo del usuario.



## 8 Almacenamiento y manipulación

### 8.1 Condiciones de envío

El producto se enviará en hielo seco. Tras la recepción, compruebe si sigue habiendo hielo seco en la caja y si los reactivos están congelados.

### 8.2 Precauciones de manipulación generales



Asegúrese de que la temperatura y la humedad en los laboratorios permanezcan entre 15 °C y 25 °C y entre el 20 % y el 85 %, respectivamente (reduce el riesgo de condensación/evaporación).

No coma, beba ni fume en las distintas zonas del laboratorio. Lleve a cabo las operaciones de mantenimiento de los equipos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Descontamine y deseche todos los reactivos, muestras y suministros asociados de acuerdo con la normativa gubernamental aplicable a sus instalaciones. Para obtener resultados precisos y reproducibles, es esencial evitar la contaminación con ADN externo, especialmente de productos de PCR de placas analizadas anteriormente. Los productos amplificados de experimentos anteriores constituyen la fuente más común de contaminación del ADN.

Los reactivos proporcionados se ven claros e incoloros, excepto la placa Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate que contiene azul de bromofenol en todos los pocillos (color azul). Si se produce algún cambio en el aspecto del material o una presunta degradación debido a un almacenamiento incorrecto que pueda afectar al rendimiento del ensayo, consulte la asistencia técnica (► capítulo 10 *Asistencia técnica*, página 48/58).

### 8.3 Advertencias y precauciones

Este producto no contiene material peligroso.



Las hojas de datos de seguridad de materiales se encuentran disponibles en <https://sysmex-inostics.com/products/kit-specs/>.

## 8 Almacenamiento y manipulación

---

En el caso de cualquier incidente grave que se produzca en relación con Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, deberá notificarse inmediatamente al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que se encuentre el usuario o el paciente.

### 8.3.1 Medidas específicas

Medidas de primeros auxilios

- **Consejo general:** En caso de efectos persistentes, consulte a un médico. Quítese inmediatamente la ropa y los zapatos contaminados y lávelos bien antes de volver a utilizarlos.
- **Si se inhala:** Retire a la persona afectada de la zona cercana. Asegure una fuente de aire fresco.
- **En caso de contacto con la piel:** Lave la zona afectada con jabón y abundante agua.
- **En caso de contacto con los ojos:** Retire las lentes de contacto. Enjuague bien con agua corriente manteniendo los ojos bien abiertos durante al menos 10 o 15 minutos. Proteja el ojo no afectado.
- **Si se ingiere:** Llame inmediatamente a un médico. No provoque el vómito. No intente nunca que una persona que haya perdido el conocimiento ingiera algo.

### 8.3.2 Manipulación y almacenamiento

Medidas generales de higiene y protección

No coma, beba, ni fume en el laboratorio y asegúrese de lavarse bien las manos antes de salir. No inhale los vapores. Evite el contacto con los ojos y la piel. Quítese inmediatamente la ropa sucia o empapada.

Precauciones para una manipulación segura

Los riesgos de manipulación del producto deben reducirse adoptando las medidas de protección y preventivas adecuadas. El proceso de trabajo debe estar diseñado para descartar la liberación de las sustancias peligrosas o el contacto con la piel en la medida de lo posible.

Consejos sobre la protección contra incendios y explosiones

No se requieren medidas especiales.

### Condiciones para un almacenamiento seguro, incluidas las posibles incompatibilidades



Mantenga el recipiente bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado. Los recipientes abiertos deberán sellarse con cuidado y mantenerse en posición vertical para evitar fugas.

#### 8.3.3 Precauciones de manipulación de reactivos



Para garantizar el uso y la eliminación adecuados de los reactivos y para evitar su contaminación, siga las precauciones que se indican a continuación:

- No utilice reactivos caducados o almacenados incorrectamente.
- Prepare los reactivos de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Los reactivos deben utilizarse únicamente con los otros reactivos del mismo kit.
- Los reactivos de kits o lotes diferentes no se deben mezclar o intercambiar.
- Registre la fecha de apertura y marque los tubos después de cada uso para garantizar que los reactivos no estén caducados o se utilicen más allá del número recomendado de ciclos de congelación y descongelación.
- Evite la contaminación de los reactivos cambiándose de guantes con frecuencia. Cámbiese de guantes siempre que vaya a manipular reactivos y muestras diferentes.
- Deseche los reactivos no utilizados y los residuos de acuerdo con la normativa medioambiental nacional, federal, estatal y local.

#### 8.3.4 Precauciones de seguridad y contaminación



Siga las precauciones enumeradas a continuación para mantener el entorno del laboratorio libre de contaminación con ADN y para garantizar la seguridad del personal:

- Separe los espacios de trabajo utilizados para las operaciones de laboratorio de pre-PCR y post-PCR y cumpla con el procedimiento

## 8 Almacenamiento y manipulación

---

unidireccional que va de «limpio» (zonas anteriores a la amplificación) a «sucio» (zonas posteriores a la amplificación).

- Asegúrese de que en cada zona de trabajo haya equipos específicos (incluidas pipetas), suministros, reactivos, recipientes para residuos con riesgo biológico y manuales de laboratorio. Nunca intercambie estos materiales entre las zonas de trabajo pre-PCR y post-PCR. Recomendamos la codificación por colores o el etiquetado de los equipos, suministros y reactivos para identificar los que pertenezcan a una zona en concreto.
- Utilice el equipamiento de protección personal adecuado durante todo el procedimiento.
  - Lleve una bata de laboratorio (preferiblemente desechable) y guantes sin polvo desechables en todo momento cuando trabaje en las zonas de pre-PCR y post-PCR.
  - Para evitar cualquier contaminación, cámbiese de guantes con frecuencia cuando manipule diferentes muestras y reactivos y después de que la piel entre en contacto con la parte exterior de los guantes.
  - Lleve gafas protectoras al menos durante la preparación del plasma, la extracción de ADN y la purificación del producto de PCR con QIAquick®.
  - Utilice fundas desechables para zapatos o cámbiese de zapatos, entre los laboratorios pre-PCR y post-PCR y utilice mangas desechables de protección para los brazos (obligatorio en el laboratorio pre-PCR y recomendado en el laboratorio post-PCR, especialmente para la purificación de PCR UID y la PCR Index).
- Al salir de las zonas de laboratorio de pre-PCR y post-PCR, quítese y deseche el equipo de protección personal.
- Manipule todas las muestras como material potencialmente infeccioso. Si se produce un derrame, se recomienda limpiar el área afectada en primer lugar con un detergente/desinfectante y agua y, a continuación, con una solución de hipoclorito de sodio (lejía) al 0,5 % preparada utilizando agua desmineralizada.

**Nota:** *La lejía doméstica líquida comercial (p. ej., de la marca Clorox) suele contener hipoclorito de sodio con una concentración*

del 5,25 %. Una dilución 1:10 de lejía doméstica producirá una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %.

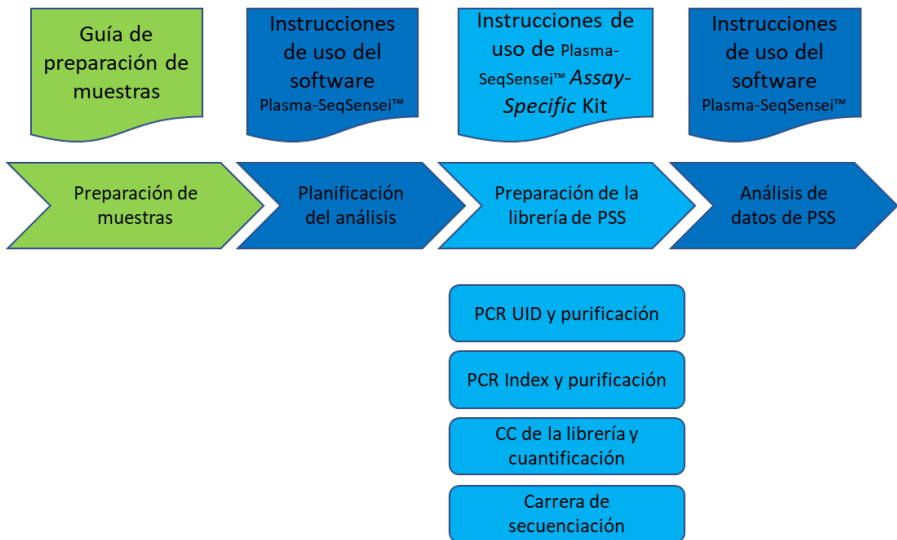
- Utilice cabinas de PCR específicas para los pasos de pipeteo.
- Después de su uso, limpie las cabinas de PCR con un desinfectante de compuestos de amonio cuaternario (como RHEOSEPT-WD plus o equivalente) y, a continuación, con un producto diseñado para eliminar los ácidos nucleicos y las nucleasas (como Roti® libre de ácido nucleico o equivalente).
- Después de su uso, limpie los espacios de trabajo para PCR con un producto diseñado para eliminar los ácidos nucleicos y las nucleasas (como Roti® libre de ácido nucleico o equivalente).
- Descontamine las cabinas de PCR y el material de laboratorio (pipetas, gradillas para tubos u otros equipos) con luz ultravioleta (UV) después de su uso. Para garantizar la eficacia de la radiación UV, limpie regularmente las bombillas de luz UV de los residuos acumulados.
- Utilice únicamente puntas de pipeta estériles resistentes a aerosoles con filtro (de lotes certificados y sin ARNasa, ADNasa ni pirógenos).
- Utilice únicamente reactivos y tubos específicos para PCR.
- No tenga abiertos al mismo tiempo más de un tubo de muestra o un tubo de reactivo.
- Para evitar la contaminación de soluciones de reactivos que tengan varios usos, prepare alícuotas de trabajo de acuerdo con las instrucciones y evite el pipeteo directo.

## 9 Procedimiento

Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit utiliza el cfDNA cuantificado del plasma para detectar el ctDNA. Antes de iniciar el procedimiento de preparación de la librería (Figura 4), tal y como se describe en estas instrucciones de uso, asegúrese de que el procedimiento de preparación de muestras se ha completado tal y como se describe en la guía de preparación de muestras de Sysmex Inostics.

Además, debe completarse la primera parte de las instrucciones de uso del software Plasma-SeqSensei™ IVD, la planificación del análisis. Si debe diluir las muestras porque su contenido de ADN es demasiado alto, consulte el ► capítulo 9.1 PCR UID (PCR Multiplex), página 22/58, de estas instrucciones de uso.

Figura 4 describe el proceso, incluidos los pasos individuales del procedimiento, así como qué instrucciones de uso para seguir todo el proceso de Plasma-SeqSensei™.



**Figura 4: El proceso de Plasma-SeqSensei™, incluidos los pasos del procedimiento y los documentos necesarios.**



Cada Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit está diseñado para analizar hasta 16 muestras en una placa.

Si se analizan más de 16 muestras en la misma carrera de secuenciación, es necesario adquirir un segundo Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, así como un Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit.

Para las muestras de la segunda placa (muestras 17 a 32), utilice la placa Index Primer Plate **IND35 (placa B)** del Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit en lugar de la placa Index Primer Plate IND34 (placa A) del Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit original.



**Advertencia:** Si se utiliza la misma placa Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate (p. ej., IND34) dos veces en el mismo análisis, los resultados no se podrán analizar.

Si se van a utilizar dos placas, prepare siempre solo una placa cada vez para cada paso del procedimiento antes de empezar con la otra placa. Cada placa contiene un control positivo (Positive Control, PC) y un control negativo (No Template Control, NTC).

**Nota:** Utilice siempre el kit de secuenciación más pequeño posible. NextSeq™ High Output kit v2.5 solo se puede utilizar para 5 o más muestras.

## 9.1 PCR UID (PCR Multiplex)

En la PCR UID Multiplex, todas las regiones diana se amplifican a la vez que se introducen secuencias código de identificadores moleculares únicas. Los UIDs permiten una reducción significativa de los errores, lo que resulta en una sensibilidad muy alta de la tecnología Plasma-SeqSensei™.

Con Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, se pueden analizar muestras con un contenido de ADN de partida entre 4,3 y 86 ng/116 µl. Las muestras con mayor contenido de ADN deben diluirse.. Las muestras con menos de 4,3 ng/116 µl no se han validado y producirán resultados inválidos.

**Nota:** La medición de las muestras con Qubit es meramente una primera aproximación del contenido de ADN de partida para determinar la carga de la muestra. La cuantificación final de las muestras, que posiblemente presente diferencias, tendrá lugar durante la secuenciación de la librería mediante el cuantificador interno (Quantispike).

## 9 Procedimiento

---

**Recomendación:** *Para obtener resultados óptimos, recomendamos un ADN de partida de 43 ng/116 µl por muestra siempre que sea posible incluso para muestras con un contenido igual o inferior a 86 ng/116 µl.*

Reactivos y kits necesarios:

- **Breast Cancer Mpx A** (tapón azul), Sysmex Inostics, nº ZR851013
- **Breast Cancer Mpx B** (tapón amarillo), Sysmex Inostics, nº ZR851014
- **Breast Cancer Positive Control** (tapón rojo), Sysmex Inostics, nº ZR855006
- **No Template Control** (tapón transparente), Sysmex Inostics, nº ZR854002
- **Quantispike** (tapón verde), Sysmex Inostics, nº ZR856001
- **PCR Master Mix v2, 2x** (tapón negro), Sysmex Inostics, nº ZR850001

Los siguientes pasos se realizan en la zona de preparación de muestras en el laboratorio pre-PCR.

Preparación:

- Todos los controles, muestras de ADN y reactivos congelados:
  - Descongele
  - Mezcle mediante vórtex durante 5 s
  - Centrifugue durante 2 s
- Compruebe el contenido total de ADN de las muestras.  
Si el contenido total de ADN es demasiado alto (p. ej. >86 ng/116 µl), diluya la muestra según el cálculo siguiente.
- Identifique los tubos LoBind® de 1,5 ml para todas las muestras que requieran dilución.
- Identifique claramente las tiras de tubos de muestra de acuerdo con la disposición de la placa.

Dilución de ADN:

Si la concentración de ADN supera la cantidad de partida máxima de 86 ng/116 µl o está cerca del límite superior, recomendamos preparar un nuevo tubo con la muestra diluida a **43 ng/116 µl**, según los siguientes cálculos:



$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{Concentración medida en ng/116 } \mu\text{l}}{43 \text{ ng/116 } \mu\text{l}}$$

$$\text{Volumen de eluato requerido } [\mu\text{l}] = \frac{135 \mu\text{l}}{\text{factor de dilución}}$$

con un volumen total de 135  $\mu\text{l}$  (para obtener más información, consulte el ► capítulo 4.2 Purificación del ADN circulante del plasma de la guía de preparación de muestras)

$$\text{Volumen de buffer AVE } [\mu\text{l}] = 135 \mu\text{l} - \text{volumen de eluato requerido}$$

$$\begin{aligned} \text{Muestra diluida } [135 \mu\text{l}] \\ = \text{volumen de eluato requerido} + \text{volumen de tampón AVE} \end{aligned}$$

**Nota:** El tampón AVE utilizado para la dilución de la muestra forma parte del QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN) (para obtener más información, consulte el ► capítulo 4.2 Purificación del ADN circulante del plasma de la guía de preparación de muestras)

#### Recuantificación de muestras diluidas

Para muestras diluidas, vuelva a cuantificar las diluciones utilizando Qubit™ según lo descrito en el ► capítulo 4.3 Cuantificación de muestras (Qubit™) de la guía de preparación de muestras.

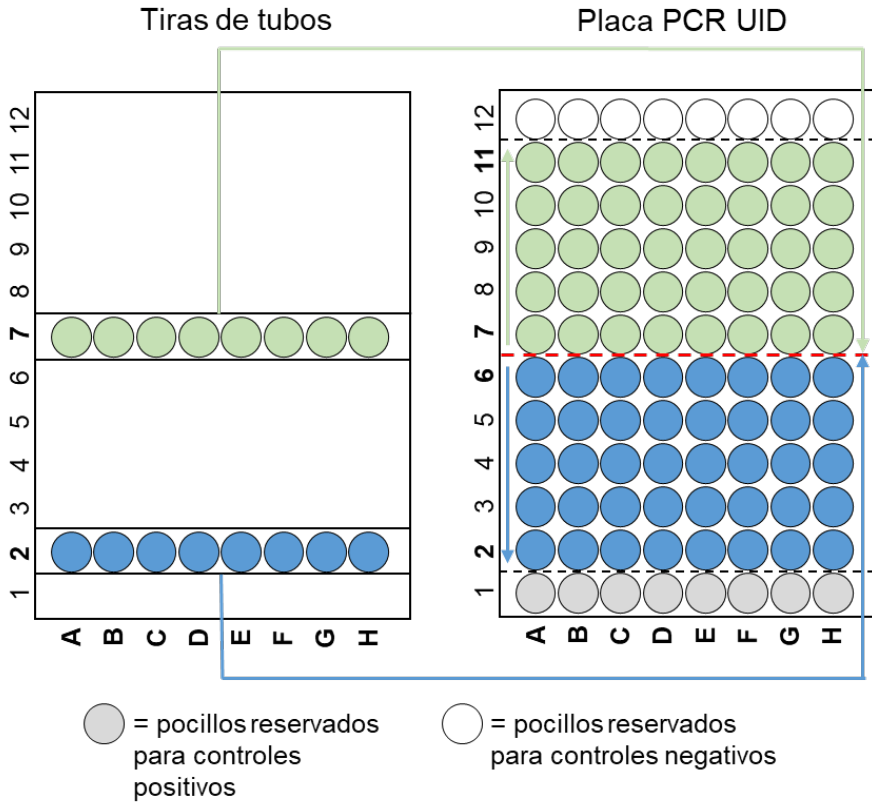
#### Configuración de la PCR UID:

**Nota:** El ADN de la muestra de plasma obtenido se somete a una PCR Multiplex en 5 réplicas/pocillos. Los controles positivos y negativos se analizan en réplicas individuales (columnas 1 y 12).

**Nota:** Las muestras se añaden a la placa PCR UID columna por columna utilizando una pipeta multicanal, como se muestra en la Figura 5 (para prevenir la contaminación). Las tiras de tubos de muestra deben colocarse en paralelo a la placa PCR UID.

**Nota:** Evite mezclar las muestras durante el procedimiento.

**Nota:** Si se procesan más de 16 muestras, realice siempre la configuración de la PCR UID para una sola placa a la vez.



**Figura 5: Esquema de pipeteo utilizado al pipetear desde las tiras de tubos a una placa PCR UID**

1. Prepare la mezcla de trabajo de PCR UID por placa según la Tabla 8: «Mezcla de trabajo PCR UID». Mezcle pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces usando pipetas de un solo canal. El volumen de la mezcla de trabajo PCR UID necesario para PC y NTC se representa en los cálculos (consulte la Tabla 8).

**Tabla 8: Esquema de pipeteo de la mezcla de trabajo PCR UID por placa**

Número de muestras (1 muestra = 5 réplicas), con exceso del 15 %	2	3	4	5	6	7	8	9
PCR Master Mix v2, 2x [μl]	400	567	734	900	1.067	1.234	1.401	1.567
Breast Cancer Mpx A [μl]	39	55	71	87	103	119	135	151
Breast Cancer Mpx B [μl]	39	55	71	87	103	119	135	151
Quantispike [μl]	3,0	4,3	5,6	6,8	8,1	9,4	10,6	11,9
Volumen final (suma)	481,0	681,3	881,6	1.080,8	1.281,1	1.481,4	1.681,6	1.880,9

Número de muestras (1 muestra = 5 réplicas), con exceso del 15 %	10	11	12	13	14	15	16
PCR Master Mix v2, 2x [μl]	1.734	1.901	2.068	2.234	2.401	2.568	2.735
Breast Cancer Mpx A [μl]	167	183	199	215	231	247	263
Breast Cancer Mpx B [μl]	167	183	199	215	231	247	263
Quantispike [μl]	13,2	14,4	15,7	17,0	18,2	19,5	20,7
Volumen final (suma)	2.081,2	2.281,4	2.481,7	2.681,0	2.881,2	3.081,5	3.281,7

**Nota:** El volumen para un PC y un NTC ya está incluido.

- Añada 34,8 μl de la mezcla de trabajo PCR UID a los pocillos de las columnas 1 y 12 según la disposición de la placa.
- Añada 23,2 μl de control positivo al pocillo de la columna 1 según la disposición de la placa y mezcle el PC pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces.

Añada 23,2 μl de control negativo al pocillo de la columna 12 según la disposición de la placa y mezcle el NTC pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces.

- Pipetee 187,5 μl de mezcla de trabajo PCR UID para cada muestra en una tira de tubos.
- Añada 125 μl de muestra al tubo correspondiente de la tira de tubos y mezcle pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces.
- Con la pipeta multicanal de 200 μl, pipetee 58 μl de muestra + mezcla de trabajo en 5 pocillos según la disposición de la placa.

## 9 Procedimiento

7. Selle la placa con una lámina adhesiva para PCR y centrifugue a 1.000×g durante 5 s.
8. Coloque la placa en el termociclador de PCR. Ponga en marcha el termociclador, inicie sesión e inicie el programa «UID BC\_v1» (Tabla 9) en un plazo de 15 minutos.

**Tabla 9: Perfil de temperatura y tiempo de UID BC\_v1**

Termociclador de PCR: Veriti

Volumen establecido: 50 µl

<input checked="" type="checkbox"/>	Tapa de calentamiento		Temperatura de la tapa	96 °C
Nº	T [°C]	Tiempo [mm:ss]	Ir al nº	Nº de ciclos
1	98	02:00	N/A	1
2	98	00:20	N/A	13
3	63	01:30	N/A	13
4	72	00:10	2	13
5	72	02:10	N/A	1
6	4	∞	N/A	1

9. Si se procesan más de 16 muestras, repita el procedimiento de PCR UID utilizando una segunda placa PCR UID comenzando por el paso 1.
10. Almacene la placa PCR UID en el laboratorio post-PCR a una temperatura entre 2 °C y 8 °C hasta 14 días, entre -15 °C y -30 °C hasta 2 meses o proceda directamente a la purificación de PCR UID (► capítulo 9.2 *Purificación de PCR UID*, página 27/58).

### 9.2 Purificación de PCR UID

El Agencourt AMPure® XP Kit se utiliza para eliminar el exceso de cebadores, que podrían interferir en la posterior PCR Index.

Reactivos y kits necesarios:

- **Agencourt AMPure® XP**, Beckman Coulter, nº A63881
- **Buffer EB** (tampón de elución), QIAGEN, nº 19086
- **Etanol** (EtOH) ≥99,8 %, para análisis
- **RNase- and DNase-free distilled water**

Los siguientes pasos se realizan en el laboratorio post-PCR.

Preparación:

- Si la placa se almacenó a una temperatura entre 2 °C y 8 °C, ejecute el programa de PCR «Remove Condensate\_v1» (Tabla 10).

**Tabla 10: Perfil de temperatura y tiempo de Remove Condensate\_v1**

Termociclador de PCR: Veriti

Volumen establecido: 50 µl

<input checked="" type="checkbox"/> Tapa de calentamiento		Temperatura de la tapa		105 °C
Nº	T [°C]	Tiempo [mm:ss]	Ir al nº	Nº de ciclos
1	4	02:00	N/A	1

- Antes de retirar el sellado, centrifugue la placa a 1.000×g durante 5 s.
- Proporcione un recipiente para los residuos líquidos.
- Prepare EtOH fresco al 70 % (Tabla 11). Invierta el tubo 10 veces.

**Recomendación:** *Prepare EtOH al 70 % durante la incubación en el paso 3 del procedimiento de purificación.*

**Tabla 11: Preparación de EtOH al 70 %**

	Medía placa (8 muestras)	Placa completa (16 muestras)
EtOH (≥99,8 %, para análisis)	9,1 ml	17,5 ml
Agua destilada	3,9 ml	7,5 ml
Total	13 ml	25 ml

- Equilibre las beads a entre 15 y 25 °C (durante unos 30 min) y resuspéndalas girando el frasco horizontalmente sobre la superficie de trabajo. Gírelo lentamente, haga una pausa después de cada giro de 180 grados y espere hasta que el líquido baje. Repita la operación hasta que las beads se hayan resuspendido de forma homogénea y ya no se vean rayas. De forma ocasional, invierta el frasco. No agite la botella de beads mediante vórtex.

## 9 Procedimiento

- Añada la solución de beads AMPure® (Tabla 12) en un reservorio utilizando una pipeta de 1 ml.

**Tabla 12: Volumen requerido de beads AMPure®**

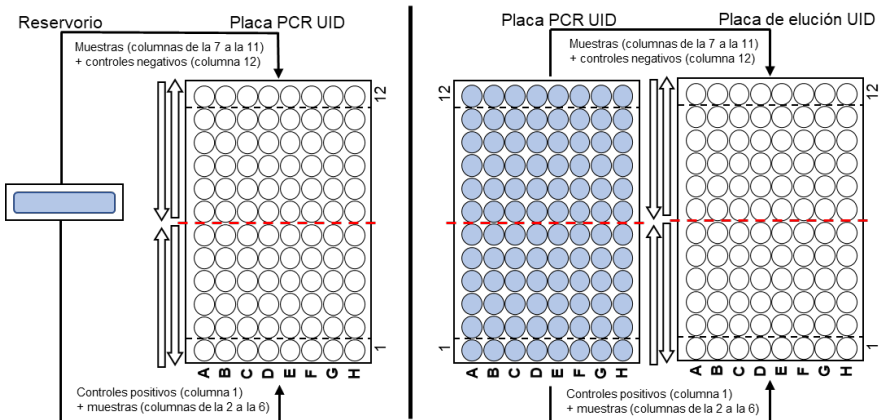
Media placa (8 muestras)	Placa completa (16 muestras)
4,4 ml	8,3 ml

- Si se van a utilizar dos placas PCR UID, realice siempre el procedimiento de purificación de PCR UID para una sola placa a la vez.

### Procedimiento de purificación:

1. Use una pipeta multicanal para los siguientes pasos. Las placas PCR UID y de eluato UID deben estar dispuestas en paralelo y el pipeteo se realiza por columnas (no por filas, Figura 6).

**Nota:** Realice todos los pasos pipeteando de izquierda a derecha.



**Figura 6: Esquema de pipeteo utilizado al pipetear del reservorio a la placa PCR UID (izquierda) o de la placa PCR UID (derecha) en una placa de eluato UID.**

2. Añada 81 µl de beads AMPure® a cada pocillo de la placa PCR UID, mezcle pipeteando lentamente 10 veces hacia arriba y hacia abajo.

**Nota:** Resuspenda las beads AMPure® 3 veces en el reservorio antes de cada aspiración.

**Nota:** *Asegúrese de que las beads no se sequen.*

3. Incube la placa PCR UID a 15 °C y 25 °C durante 10 minutos.
4. Coloque la placa PCR UID en la placa magnética (Alpaqua) e incube durante 5 minutos.
5. Asegúrese de que todas las beads están unidas al imán. Retire con cuidado el sobrenadante pipeteando 134 µl.

**Nota:** *No altere el anillo de beads magnéticas separadas. Mueva la punta de la pipeta hasta el fondo del pocillo sin tocar la pared.*

6. Transfiera el EtOH al 70 % a un reservorio (Tabla 13).

**Tabla 13: Volumen requerido de EtOH al 70 %**

Media placa (8 muestras)	Placa completa (16 muestras)
13 ml	25 ml

7. Añada 100 µl de EtOH al 70 % a cada pocillo sin resuspender. Incube durante 30 s.
8. Mantenga la placa en el imán. Retire con cuidado 110 µl de EtOH y deséchelo.
9. Añada 100 µl de EtOH al 70 % a cada pocillo sin resuspender. Incube durante 30 s.
10. Mantenga la placa en el imán. Retire con cuidado 100 µl de EtOH y deséchelo.
11. Retire el EtOH restante con la pipeta multicanal de 20 µl.
12. Retire la placa PCR UID del imán y déjela secar durante 2 minutos.
13. Añada el volumen requerido de Buffer EB en un reservorio (Tabla 14).

**Tabla 14: Volumen requerido de Buffer EB**

Media placa (8 muestras)	Placa completa (16 muestras)
7 ml	13 ml

14. Añada 120 µl de Buffer EB a cada pocillo para eluir el ADN y mezcle al menos 10 veces hacia arriba y hacia abajo con cuidado.

15. Verifique visualmente que todas las beads estén suspendidas en la solución.
16. Incube la placa PCR UID durante 2 minutos a 15 °C y 25 °C.
17. Coloque la placa PCR UID en el imán e incube durante 1 minuto.
18. Transfiera con cuidado 110 µl de cada pocillo de eluato a una nueva placa de eluato UID y deseche la placa PCR UID.
19. Proceda directamente con la PCR Index o selle la placa de eluato UID. Guárdela a una temperatura entre 2 °C y 8 °C hasta 7 días o entre -15 °C y -30 °C hasta 2 meses.
20. Si se procesan más de 16 muestras, repita el procedimiento de purificación de PCR UID utilizando la segunda placa PCR UID empezando por el paso 2.

### 9.3 PCR Index

La PCR Index se realiza para amplificar productos de PCR UID purificados a la vez que se introducen etiquetas de indexación (códigos de barras de pocillos) y adaptadores de secuenciación de Illumina.

Cada Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit contiene una placa Index Primer Plate IND34 (placa A) para un máximo de 16 muestras. Si se analizan más de 16 muestras en una carrera de secuenciación, se debe utilizar una segunda placa Index Primer Plate IND35 (placa B) del Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit.

**Nota:** No use la misma placa Index Primer Plate dos veces en la misma carrera de secuenciación. Use siempre dos placas Index Primer Plates diferentes (IND34 + IND35 / placa A + placa B).

Los pocillos de las placas Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plates son de un solo uso.

Las posiciones de las placas Index Primer Plates secas deben coincidir con las de la placa PCR final, así como con la disposición de la placa en la herramienta de planificación del análisis del software Plasma-SeqSensei™ IVD (Figura 7). Tenga en cuenta los pocillos que ya se han utilizado. Al planificar el siguiente análisis, utilice las posiciones/pocillos de Index restantes y transfiera la información al software.



Plate A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	Sample1				Sample2				NTC		
B		Sample3				Sample4						
C		Sample5				Sample6						
D		Sample7				Sample8						
E												
F												
G												
H												

Figura 7: Ejemplo de disposición de la placa PCR Index

Reactivos y kits necesarios:

- **Index Primer Plate IND34** (placa A), Sysmex Inostics, n° ZR852004
- *Opcional: Index Primer Plate IND35* (placa B), Sysmex Inostics, n° ZR852005
- **PCR Master Mix v2, 2x** (tapón negro), Sysmex Inostics, n° ZR850001
- **Water, nuclease-free** (tapón transparente/blanco), Sysmex Inostics, n° ZR224006
- **Buffer EB** (tampón de elución), QIAGEN, n° 19086

Los siguientes pasos se realizan en el laboratorio post-PCR.

Preparación:

- Provéase de todos los reactivos:
  - Descongele
  - Mezcle mediante vórtex durante 5 s
  - Centrifugue durante 2 s
- Identifique todos los plásticos requeridos (tubo de mezcla de trabajo PCR Index, reservorio desechable, placa DIL y placa PCR Index).
- Coloque el Buffer EB (Tabla 15) requerido en un reservorio y tápelos hasta su uso.

Tabla 15: Volumen requerido de Buffer EB

Media placa (8 muestras)	Placa completa (16 muestras)
5,5 ml	10 ml

- Si la placa se almacenó a una temperatura entre 2 °C y 8 °C, ejecute el programa de PCR «Remove Condensate\_v1».

## 9 Procedimiento

---

- Si la placa de eluato UID estaba guardada, centrifúguela a 1.000×g durante 5 s.
- Si se procesan dos placas de eluato UID, realice siempre el procedimiento de PCR Index para una sola placa a la vez.

### Preparación de la placa de dilución (DIL):

**Nota:** *Utilice una pipeta multicanal para todos los pasos de la preparación de la placa DIL.*

**Nota:** *Si la placa estaba guardada, mezcle cada pocillo de la placa de eluato UID pipeteando 5 veces hacia arriba y hacia abajo.*

1. Coloque la placa de eluato UID en el imán e incube durante 1 minuto.
2. Añada 99 µl de Buffer EB por pocillo a la placa DIL según la disposición de la placa.
3. Transfiera 5 µl por pocillo de la placa de eluato UID a la placa DIL, enjuague la punta de la pipeta pipeteando hacia arriba y hacia abajo 3 veces.
4. Mezcle bien pipeteando 70 µl hacia arriba y hacia abajo 10 veces.
5. Selle la placa de eluato UID. Guarde la placa con un volumen residual a una temperatura entre 2 °C y 8 °C hasta 7 días o entre -15 °C y -30 °C hasta 2 meses.

### Preparación de la placa Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate:

6. Centrifugue la placa Index Primer Plate a 1.000×g durante 5 s.
7. Prepare la cantidad requerida de pocillos de la placa Index Primer Plate perforando la lámina de aluminio con puntas de 200 µl.

**Nota:** Compruebe si se ha utilizado la placa correcta (IND34 o IND35 / A o B) en la orientación correcta.

### Preparación de PCR Index:

8. Prepare la mezcla de trabajo PCR Index según la Tabla 16. Mezcle mediante vórtex durante 5 s y centrifugue durante 2 s.

**Tabla 16: Esquema de pipeteo de la mezcla de trabajo PCR Index por placa**

Número de muestras, con exceso del 10 %	2	3	4	5	6	7	8	9
PCR Master Mix v2, 2x [µl]	165	234	303	371	440	509	578	646
Water, nuclease-free [µl]	99	140	181	223	264	305	347	388
Volumen final (suma)	264	374	484	594	704	814	925	1.034

Número de muestras, con exceso del 10 %	10	11	12	13	14	15	16
PCR Master Mix v2, 2x [µl]	715	784	853	921	990	1.059	1.128
Water, nuclease-free [µl]	429	470	512	553	594	635	677
Volumen final (suma)	1.144	1.254	1.365	1.474	1.584	1.694	1.805

**Nota:** El volumen para un PC y un NTC ya está incluido.

- Añada 20 µl de la mezcla de trabajo PCR Index por pocillo en la placa Index Primer Plate.

**Recomendación:** *Transfiera la mezcla de trabajo a las tiras de tubos, lo que permitirá utilizar una pipeta multicanal para su transferencia a la placa. Asegúrese de utilizar puntas de pipeta nuevas cada vez.*

- Añada 5 µl de muestra de la placa DIL a la placa Index Primer Plate y mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces hasta que los reactivos se resuspendan. Use una pipeta multicanal. Después de su uso, deseche la placa DIL.

**Nota:** *Compruebe visualmente la orientación correcta de la placa DIL y de la placa Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate para evitar que se mezclen las muestras.*

**Nota:** *Compruebe si hay puntos azules visibles en el fondo de los pocillos después de la resuspensión. Un punto azul es una indicación de que los reactivos se han resuspendido insuficientemente. Si los puntos azules siguen siendo visibles, repita la resuspensión, pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces hasta que no se vean puntos azules y el líquido se haya vuelto azul.*

## 9 Procedimiento

11. Selle la placa Index Primer Plate con una lámina adhesiva para PCR y centrifugue a 1.000×g durante 5 s.
12. En caso de utilizar solo una parte de la placa Index Primer Plate, transfiera todo el volumen de la placa a una nueva placa PCR.

**Nota:** Compruebe la orientación correcta de la placa Plasma-SeqSensej™ Index Primer Plate y la nueva placa PCR para evitar que se mezclen las muestras.

**Recomendación:** Utilice dos veces la pipeta multicanal de 20 µl en lugar de una vez la pipeta multicanal de 200 µl.

13. Selle la nueva placa PCR con una lámina adhesiva para PCR y centrifugue a 1.000×g durante 5 s.
14. Selle los pocillos usados de la placa Index Primer Plate (aplicable únicamente si la placa Index Primer Plate no se va a desechar) y guárdela a una temperatura entre 2 °C y 8 °C en un lugar oscuro.
15. Inicie la PCR con el programa «IDX BC\_v1» (Tabla 17) durante los siguientes 15 minutos.

**Tabla 17: Perfil de temperatura y tiempo de IDX BC\_v1**

Termociclador de PCR: Veriti

Volumen establecido: 25 µl

Tapa de calentamiento      Temperatura de la tapa: 96 °C

Nº	T [°C]	Tiempo [mm:ss]	Ir al nº	Nº de ciclos
1	98	00:30	N/A	1
2	98	00:10	N/A	20
3	65	00:10	N/A	20
4	72	00:10	2	20
5	72	05:00	N/A	1
6	4	∞	N/A	1

16. Si se procesan más de 16 muestras, repita el procedimiento de PCR Index utilizando la segunda placa de eluato UID empezando por el paso 1.

17. Después de la PCR, centrifugue las placas PCR Index a 1.000×g durante 5 s. Guarde las placas a una temperatura entre 2 °C y 8 °C hasta 7 días, entre -15 °C y -30 °C hasta 2 meses o proceda directamente a la purificación de PCR Index.

## 9.4 Purificación de PCR Index

**Importante:** *Este paso combina todos los pocillos de muestra y de control de una placa en una librería. Si se prepararon dos placas (IND34 e IND35/placa A y placa B) combine únicamente las muestras y los controles de una placa para obtener dos librerías de secuenciación. Además, la purificación elimina los dNTPs, los cebadores, los dímeros de cebadores y las sales que podrían dificultar la secuenciación posterior.*

Reactivos y kits necesarios:

- **Agencourt AMPure® XP**, Beckman Coulter, A63881
- **QIAquick® PCR Purification Kit**, QIAGEN, n° 28104 o n° 28106
- **Buffer PB**, QIAGEN, n° 19066
- **Etanol (EtOH) ≥99,8 %**, para análisis
- **RNase- and DNase-free distilled water**

Los siguientes pasos se realizan en el laboratorio post-PCR.

Preparación:

- Si la placa se almacenó a una temperatura entre 2 °C y 8 °C, ejecute el programa de PCR «Remove Condensate\_v1».
- Identifique todos los plásticos requeridos (tubo(s) de dilución de EtOH, tubo(s) de dilución de PB, columna(s) de centrifugación, tubo(s) de eluato de QIAquick®, tubo(s) de eluato Index).
- Prepare un recipiente para los residuos líquidos.
- Prepare EtOH fresco al 70 % según la Tabla 18. Invierta 10 veces.

**Tabla 18: Preparación de EtOH al 70 %**

Reactivo	Volumen
EtOH ≥99,8 %, para análisis [ml]	2,8
Agua destilada [ml]	1,2
Volumen necesario [ml]	4,0

## 9 Procedimiento

- Antes de retirar el sellado, centrifugue la placa PCR Index a 1.000×g durante 5 s.
- Extraiga todo el líquido de **todos los pocillos (muestras y controles) de una placa** pipeteando 2 x 15 µl en un recipiente adecuado utilizando una pipeta de 20 µl.

**Nota:** Si se utiliza una pipeta multicanal, agrupe primero todos los pocillos por columna en una fila de una nueva tira de la placa PCR. A continuación, transfiera el contenido de cada pocillo a un recipiente adecuado con una pipeta monocanal.

- Si se van a utilizar dos placas PCR Index, realice siempre la purificación de PCR Index para una sola placa a la vez.

**Nota:** Use una pipeta monocanal para los siguientes pasos en este protocolo.

### Primera purificación con QIAquick®:

1. Para la purificación con PCR Purification Kit de QIAquick®, consulte el protocolo «QIAquick PCR Purification using a Vacuum Manifold» en el manual del fabricante. A continuación, se describen las variaciones en la manipulación.
2. En primer lugar, añada el volumen calculado (consulte la Tabla 19) del Buffer PB al tubo respectivo, mezcle mediante vórtex durante 3 s y centrifugue a 500×g durante 2 s.

**Tabla 19: Cálculo del volumen requerido del Buffer PB**

Reactivo	Por pocillo	___ pocillos
Volumen de muestra [µl]	25	
Buffer PB [µl]	125	
Volumen total [µl]	150	

3. Realice los siguientes pasos de purificación de PCR según las instrucciones descritas en el manual de QIAGEN.

**Nota:** El volumen máximo de carga de la columna es de 800 µl. Para volúmenes de muestras agrupadas superiores a 800 µl, use un tubo de extensión o cargue de nuevo.

**Nota:** Compruebe visualmente en cada paso que se aplique el volumen correcto a la columna y que todo el líquido pase por el filtro.

**Nota:** En caso de que las columnas estén obstruidas, consulte la guía de solución de problemas del manual de QIAGEN.

4. Para el eluato del ADN, coloque una columna QIAquick® en un tubo LoBind® limpio de 1,5 ml.
5. Añada 50 µl del Buffer EB al centro de la membrana QIAquick® e incube durante 1 minuto a 15 °C y 25 °C antes del último paso de centrifugación.

**Nota:** No eluya dos veces.

### Segunda purificación con beads AMPure®:

6. Transfiera 45 µl de eluato a un nuevo tubo LoBind®. Deseche el anterior.
7. A) Si utiliza el frasco original de AMPure®, deje que las beads se equilibren a entre 15 y 25 °C (durante unos 30 min), y resuspéndalas girando el frasco horizontalmente sobre la superficie de trabajo. Gire lentamente, haga una pausa después de un giro de 180 grados y espere hasta que el líquido baje. Repita el proceso hasta que las beads se resuspendan de forma homogénea.  
B) Si utiliza alícuotas de las beads AMPure®, deje que se equilibren a una temperatura entre 15 y 25 °C, y mezcle las beads invirtiéndolas al menos 10 veces. Asegúrese de que las beads estén completamente resuspendidas.
8. Añada 40 µl de beads AMPure® al eluato, mezcle mediante vórtex durante 10 s y centrifugue 3 s.
9. Incube a 15 °C y 25 °C durante 5 minutos.
10. Abra el tubo, colóquelo en el DynaMag-2 e incube durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Los siguientes pasos (del 11 al 15) se realizan mientras los tubos están en la gradilla magnética:

11. Retire el sobrenadante y deséchelo utilizando una pipeta de 200 µl, ajustada a 100 µl.

## 9 Procedimiento

---

**Nota:** Levante el tubo aproximadamente 1 cm y presione el fondo completamente contra el imán para garantizar que todas las beads se adhieran.

12. Añada 500 µl de EtOH al 70 % e incube durante 30 s a 15 °C y 25 °C.
13. Retire el sobrenadante y deséchelo.
14. Añada 500 µl de EtOH al 70 % e incube durante 30 s a 15 °C y 25 °C. Durante la incubación, gire el tubo alrededor del eje vertical 180 grados para garantizar una mezcla eficaz. Vuelva a girar lentamente como mínimo después de 5 s.
15. Retire todo el sobrenadante y deséchelo. Retire el EtOH restante con la pipeta de 20 µl.
16. Retire el tubo del DynaMag-2 y déjelo secar durante 2 minutos a 15 °C y 25 °C con la tapa abierta.
17. Añada 15 µl de Buffer EB y resuspenda completamente la mezcla de beads mezclando mediante vórtex durante 10 s. Centrifugue durante 3 s e incube durante 1 minuto a 15 °C y 25 °C.
18. Abra el tubo, colóquelo en el DynaMag-2 e incube durante 1 minuto a 15 °C y 25 °C.
19. Usando una pipeta de 20 µl, ajústela a 20 µl para transferir todo el sobrenadante al tubo de eluato Index.

**Nota:** Levante el tubo aproximadamente 1 cm y presione el fondo completamente contra el imán para garantizar que todas las beads se adhieran.

20. Deseche el tubo identificado como «Eluato de QIAquick®».
21. Guarde el tubo de eluato Index a una temperatura entre 2 °C y 8 °C hasta 7 días o entre -15 °C y -30 °C hasta 2 meses o proceda directamente a la cuantificación en Bioanalyzer.
22. Si se procesan más de 16 muestras, repita el procedimiento de purificación de PCR Index utilizando la segunda placa PCR Index empezando por el paso 2.



## 9.5 CC de la librería (Bioanalyzer)

El CC de la librería se lleva a cabo utilizando un Bioanalyzer para comprobar la presencia de productos secundarios en cada librería y la determinación del tamaño medio. Para cada librería, las cuantificaciones deben realizarse en tres réplicas.

Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit se ha desarrollado utilizando el Bioanalyzer DNA 1000 Kit de Agilent.

Reactivos y kits necesarios:

- **DNA 1000 Kit**, Agilent, nº 5067-1504
- **Buffer EB** (tampón de elución), QIAGEN, nº 19086
- **RNase- and DNase-free distilled water**

Los siguientes pasos se realizan en el laboratorio post-PCR.

Preparación del Bioanalyzer:

Deje que los reactivos se equilibren a entre 15 y 25 °C durante 30 min en un lugar oscuro.

Para todos los pasos, consulte el manual del Bioanalyzer Agilent.

**Nota:** La medición de la muestra debe realizarse en tres réplicas técnicas.

Preparación de la dilución del Bioanalyzer (BA\_DIL):

1. Calcule los **volúmenes requeridos para BA\_DIL**:

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{ADN total de partida}}{4,3}$$

con el ADN total de partida de todas las muestras analizadas en ng/116µl + 4,3 ng para cada control positivo (PC).

(medido con Qubit™, consulte el ► capítulo 4.3 Cuantificación de muestras (Qubit™) de la guía de preparación de muestras)

**Nota:** Si el factor de dilución es <1, no diluya el eluato Index; utilícelo directamente para la medición del CC, la cuantificación y la dilución de 2 nM.

## 9 Procedimiento

**Buffer EB** [ $\mu\text{l}$ ] = (3 \* factor de dilución) – 3  $\mu\text{l}$

**BA\_DIL** [ $\mu\text{l}$ ] = 3  $\mu\text{l}$  eluato Index + X  $\mu\text{l}$  Buffer EB

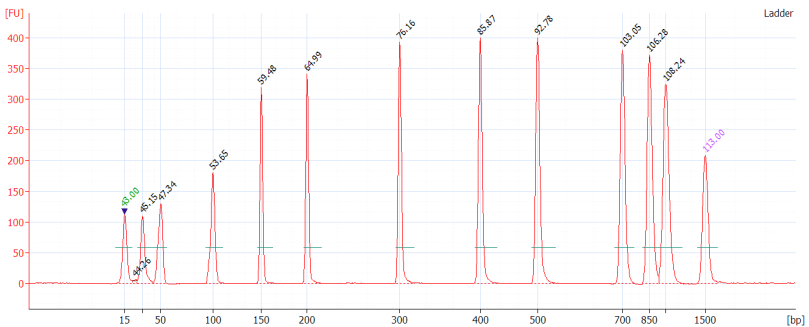
2. Diluya el eluato Index en un tubo nuevo según el cálculo. Mezcle mediante vórtex brevemente y centrifugue durante 3 s. Guarde el eluato Index restante a una temperatura entre 2 °C y 8 °C hasta 7 días o entre -15 °C y -30 °C hasta 2 meses.

**Nota:** Asegúrese de que se dispone de al menos 10  $\mu\text{l}$  de volumen total de BA\_DIL.

**Nota:** La BA\_DIL es estable a una temperatura entre 2 °C y 8 °C hasta 7 días o entre -15 °C y -30 °C hasta 2 meses.

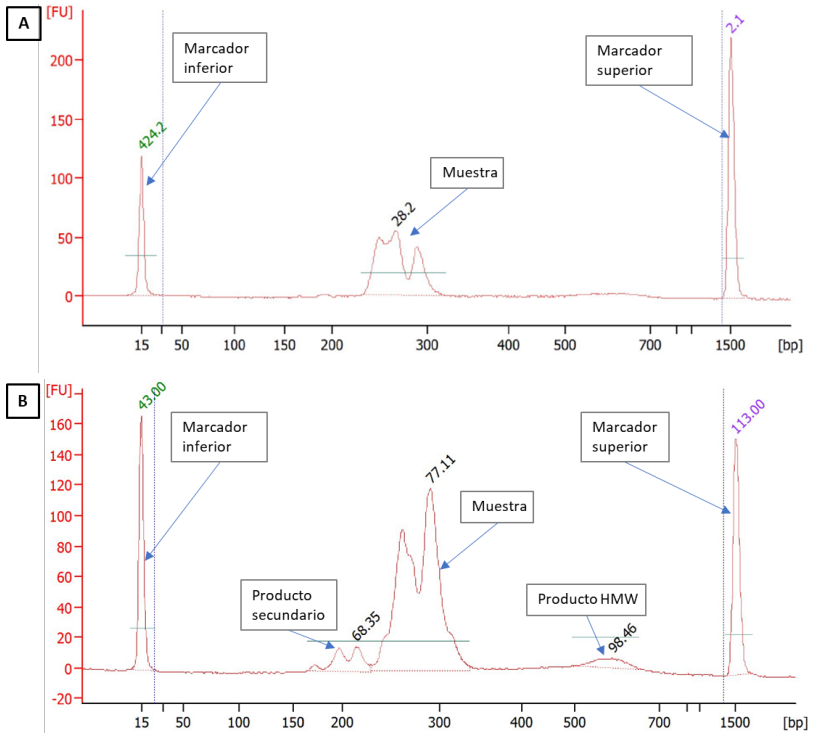
### Análisis de datos:

3. Compruebe que el perfil del [Ladder Plot] (Diagrama de escalera) es similar a Figura 8 y contiene 13 picos, el más bajo a 15 pb y el más alto a 1.500 pb (estos son los marcadores que estarán en cada muestra) con una base de referencia fija (consulte la Figura 8).



**Figura 8: Electroferograma del Ladder (Bioanalyzer)**


4. Haga doble clic en el electroferograma perteneciente al Pocillo 1 y seleccione la pestaña [Peak Table] (Tabla de picos) (consulte la Figura 9).



**Figura 9: Electroferogramas de muestra en un Bioanalyzer. (A) Un electroferograma óptimo sin productos secundarios, (B) un electroferograma ejemplo con productos secundarios (p. ej., dímero del cebador y gDNA (producto HMW)).**

5. Seleccione [Manual Integration] (Integración manual) haciendo clic con el botón derecho en el electroferograma.
6. Use las líneas azules para delimitar **todos los picos visuales**, es decir, el producto de la muestra, el dímero del cebador (producto secundario) y el producto de alto peso molecular (High Molecular Weight, HMW) **a lo largo de la línea cero** (se muestra en la Figura 9B).

**Nota:** Utilice la tecla «Ctrl» para separar los extremos de las líneas azules de la línea roja. Si se selecciona una línea, elimínela haciendo clic con el botón derecho en [Remove Peak] (Eliminar pico). Inserte líneas azules adicionales en cualquier posición haciendo clic con el botón derecho en [Add Peak] (Añadir pico).

7. Con [Peak Description] (Descripción de picos) () , seleccione [Peak Molarity] (Molaridad de picos) para mostrar la molaridad respectiva de cada pico.
8. Guarde el archivo.
9. Repita los pasos del 4 al 8 para los pocillos restantes de cada réplica.
10. Calcule la media, la variación estándar y el coeficiente de variación (CV) de la suma de molaridades de todos los productos basándose en la medición por triplicado.

Criterios de aceptación y rechazo:

- Comprobación de la calidad del ADN: si la suma del producto, el dímero del cebador y el HMW es <2,0 nmol/l, la concentración de ADN es demasiado baja para la secuenciación.
- Criterio de aceptación de la relación señal-ruido de fondo (Signal-to-Noise Ratio, SNR):  $\geq 90 \%$

$$SNR [\%] = \frac{\text{molaridad del producto específico}}{\text{suma del producto específico, secundario y de alto peso molecular (HMW)}} * 100$$

- Criterio de aceptación del control de precisión: CV de la suma de molaridades de todos los productos  $\leq 10 \%$

$$\text{Coeficiente de variación} [\%] = \frac{\text{desviación estándar}}{\text{media}} * 100$$

**Nota:** Calcule la variación estándar a partir de una muestra.

**Nota:** Si la relación señal-ruido de fondo falla debido a un pico inespecífico, este valor puede excluirse de los cálculos.

**Nota:** Si el CV de las mediciones por triplicado es  $>10 \%$ , el valor más bajo podrá eliminarse de los cálculos de la muestra, siempre que los otros dos valores cumplan los criterios de aceptación.

**Nota:** Si uno o más criterios fallan, prepare una nueva BA\_DIL y repita el análisis con el Bioanalyzer.

## 9.6 Secuenciación de NextSeq™ 500/550 de Illumina

La secuenciación de las librerías se realiza con un equipo NextSeq™ 500 o 550 de Illumina, como se describe en las instrucciones de uso proporcionadas por Illumina.

Reactivos y kits necesarios:

- **NextSeq™ 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 ciclos)**, Illumina, nº 20024904  
≤377 ng de ADN de partida total (según el ► capítulo 4.3 *Cuantificación de muestras (Qubit™)* de la guía de preparación de muestras de Qubit™) O
- **NextSeq™ 500/550 High Output Kit v2.5 (150 ciclos)**, Illumina, nº 20024907  
≤1.304 ng de ADN de partida total (según el ► capítulo 4.3 *Cuantificación de muestras (Qubit™)* de la guía de preparación de muestras de Qubit™)
- **Hidróxido de sodio (NaOH)**, 1 M
- **Solución de hidrocloreuro Trizma®** pH 7,0, 1 M
- **Buffer EB** (tampón de elución), QIAGEN, nº 19086
- **Rnase- and DNase-free distilled water**

Los siguientes pasos se realizan en el laboratorio post-PCR.

Preparación de las muestras (concentración inicial de la librería de 2 nM) para la secuenciación:

1. Calcule el volumen total requerido de cada librería de 2 nM:

$$\text{Volumen total } [\mu\text{L}] = \frac{3 \mu\text{L BA\_DIL} * \text{Concentración}_{\text{librería en nM}}}{2 \text{ nM}}$$

2. Calcule el volumen requerido de **Buffer EB**:

$$\text{Volumen}_{\text{Buffer EB}} [\mu\text{L}] = \text{Volumen total} - 3 \mu\text{L BA\_DIL}$$

3. Prepare una dilución de librería de 2 nM para cada librería según el siguiente cálculo:

$$2 \text{ nM dilución de librería} = 3 \mu\text{l BA\_DIL} + \text{Volumen}_{\text{Buffer EB}}$$

**Nota:** No pipetee <3  $\mu\text{l}$ .

**Nota:** Si el volumen de dilución de 2 nM es <10  $\mu\text{l}$ , ajuste el volumen total.

4. *Opcional:* Si se procesan dos placas con el Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit, combine las dos diluciones de librerías de 2 nM separadas en una mezcla final de 10  $\mu\text{l}$  según las siguientes ecuaciones:

$$\text{ADN de partida}_{\text{total}} = \sum \text{ADN de partida}_{\text{placaA}} + \sum \text{ADN de partida}_{\text{placaB}}$$

$$\text{Volumen}_{\text{placaA}} = \frac{10 \mu\text{l}}{\text{ADN de partida}_{\text{total}}} * \text{ADN de partida}_{\text{placaA}}$$

$$\text{Volumen}_{\text{placaB}} = \frac{10 \mu\text{l}}{\text{ADN de partida}_{\text{total}}} * \text{ADN de partida}_{\text{placaB}}$$

**Nota:** Pipetee únicamente volúmenes dentro de los rangos aceptados de las pipetas disponibles. Si hay que pipetear volúmenes más bajos, aumente el volumen total de la mezcla final del grupo de librerías.

5. Realice la desnaturalización de la librería (agrupada) con NaOH 0,2 M recién preparado (consulte la Tabla 20). Mezcle mediante vórtex durante 5 s y centrifugue durante 3 s.

**Tabla 20: Volúmenes necesarios para la desnaturalización y dilución de la librería.**

Librería	NaOH 0,2 M	Tris-HCl 0,2 M	Tampón HT1
10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	970 $\mu\text{l}$

6. Incube la librería (agrupada) durante 5 min a entre 15 y 25 °C.
7. Agregue 10  $\mu\text{l}$  de Tris-HCl 0,2 M, pH 7,0 a la librería desnaturalizada (agrupada) (consulte la Tabla 20). Mezcle mediante vórtex durante 5 s y centrifugue durante 3 s.

8. Diluya la librería desnaturalizada (agrupada) a 20 pM añadiendo 970 µl de tampón HT1 pre-enfriado (suministrado con el kit de secuenciación Illumina; consulte la Tabla 20). Mezcle mediante vórtex durante 5 s y centrifugue durante 3 s.
9. Diluya la librería desnaturalizada (agrupada) 20 pM con tampón HT1 en un tubo nuevo hasta la concentración de carga final óptima según el kit de secuenciación y el dispositivo de secuenciación elegidos (consulte la Tabla 21). Mezcle mediante vórtex durante 5 s y centrifugue durante 3 s.

**Importante:** *Cada dispositivo de secuenciación puede tener una concentración de carga final óptima diferente, que debe determinar el usuario. Comience usando nuestra concentración de carga final recomendada conforme a lo indicado en la Tabla 21. Aumente la concentración de carga si la densidad de grupos es baja y disminúyala si se observa sobreagrupamiento en las carreras.*

**Tabla 21: Volúmenes requeridos para la concentración final de carga recomendada para la secuenciación**

	Mid Output Kit	High Output Kit
<b>Concentración final recomendada</b>	1,0 pM	1,1 pM
<b>Entrada de la librería</b>	65 µl	71 µl
<b>Tampón HT1</b>	1.235 µl	1.229 µl

10. Inicie la carrera de secuenciación usando NextSeq Control si se ha implementado un procedimiento de demultiplexación distinto en el sitio de secuenciación (por ejemplo, bcl2fastq de Illumina). De lo contrario, utilice el Local Run Manager del dispositivo NextSeq para iniciar la carrera de secuenciación.
11. Lleve a cabo el inicio de la carrera de secuenciación según el protocolo de Illumina (Guía del sistema NextSeq™ 550, documento nº 15069765v06) utilizando los siguientes «Run Parameter Settings» (Ajustes de parámetros de análisis) especificados en la Tabla 22:

**Tabla 22: Parámetros de secuenciación**

Tipo de Read	Read única		
	Read 1	Index 1	Index 2*
Longitud de Read	148	10	10

\* La longitud de Read del índice 2 solo se incluirá con el uso de dos placas en la misma carrera de secuenciación.

12. Cuando utilice el Local Run Manager, incluya la siguiente configuración del adaptador en Tabla 23 (puede copiarse de la hoja de muestra) en la «Advanced Module Settings» (Configuración avanzada del módulo):

**Tabla 23: Configuración del adaptador para el Local Run Manager**

Nombre	Secuencia
Adaptador	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA

**Importante:** La densidad de grupos no debe ser superior a 220 K/mm<sup>2</sup>. Si la densidad de grupos es >220 K/mm<sup>2</sup>, repita la carrera de secuenciación con una menor concentración de carga. El rango recomendado para la densidad de grupos es de 150-220 K/mm<sup>2</sup>.

**Siguientes pasos**

Consulte las instrucciones de uso del software Plasma-SeqSensei™ IVD (módulo de análisis de datos) para proceder al análisis de los datos de secuenciación.



## 10 Asistencia técnica

Si ocurre algún problema durante el procedimiento con Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, póngase en contacto con el servicio de asistencia local de Sysmex para obtener ayuda.



**Nota:** *La guía de preparación de muestras y las instrucciones de uso del Plasma-SeqSensei™ IVD assay y el Plasma-SeqSensei™ IVD Software están disponibles en diferentes idiomas en <https://sysmex-inostics.com/products/kit-specs/>.*

# 11 Características de funcionamiento

## 11.1 Sensibilidad analítica

La evaluación del límite de detección (Limit of Detection, LoD) se llevó a cabo de acuerdo con las especificaciones establecidas en la guía *CLSI EP17-A2*.

El análisis incluyó inserciones, deleciones, sustituciones y deleciones-inserciones.

El umbral de decisión clínica derivado del LoD es de 6 moléculas mutantes (MM).

Analito (MM)	Tasa de aciertos en % (n=108)	LoD95
20	100	3,81 MM (CI95 3,25 – 4,65 MM)
10	100	
5	99,0	
2,5	87,0	
1,25	62,5	
0,625	41,7	

## 11.2 Especificidad analítica

El diseño se comprobó in-silico mediante el análisis BLAST contra la posible reactividad cruzada y se ha confirmado que es altamente específico. Las secuencias fuera de objetivo incluían el genoma humano, así como secuencias de ADN disponibles de microorganismos/virus típicos transmitidos por la sangre, como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, VIH y virus de la hepatitis C.

## 11.3 Precisión/repetibilidad

La evaluación de la precisión se llevó a cabo de acuerdo con las especificaciones establecidas en la guía *CLSI EP05-A3*.

La precisión cualitativa es >99 %.

La repetibilidad cuantitativa es <10 % (CV máx.) y la precisión intermedia es <15 % a  $\geq 20$  MM.

MM objetivo	Repetibilidad (CV máx. en %)	Precisión intermedia
500	2,54	13,84
100	5,99	13,10
50	7,76	14,15
20	5,65	14,02

### 11.4 Rango de medición/linealidad

La determinación del rango lineal en el ADN de partida se llevó a cabo de acuerdo con las especificaciones establecidas en la guía *CLSI EP06-A*.

El procedimiento de Plasma-SeqSensei™ muestra linealidad dentro del rango de ADN de partida del ensayo (4,3 a 86 ng por muestra).

### 11.5 Sustancias que interfieren

La determinación de las sustancias que interfieren se llevó a cabo de acuerdo con las especificaciones establecidas en la guía *CLSI EP07-A2*.

Se ha confirmado que el procedimiento de Plasma-SeqSensei™ es robusto frente a las sustancias que interfieren más comunes. La presencia de hemoglobina ( $\leq 2$  g/l), bilirrubina ( $\leq 200$  mg/l), triglicéridos ( $\leq 15$  g/l), melanina ( $\leq 0,2$   $\mu$ g/l) y etanol ( $\leq 86,8$  mmol/l) no afectan a la validez y los resultados de la prueba.

### 11.6 Resultado clínico y características

El resultado clínico del Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD kit se determinó analizando 76 muestras positivas y 78 muestras negativas para todos los genes diana. La sensibilidad es del 97 % (CI del 95 %: 90,9-99,3 %), mientras que la especificidad es del 95 % (CI del 95 %: 87,5-98 %).

## 11 Características de funcionamiento

---

		Método de referencia: BC_P2 test		
		Positivo	Negativo	Total
Plasma- SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit	Positivo	74	4	78
	Negativo	2	74	76
	Total	76	78	154

El porcentaje de concordancia global es del 96,1 %.

### 11.7 Limitaciones

Los datos de rendimiento de las muestras en el límite del rango permitido para el ADN de partida pueden desviarse de los valores indicados y dar como resultado una precisión y una repetibilidad menores para las muestras de baja concentración, así como valores de LoD más bajos para las muestras de alta concentración.

## 12 Glosario y terminología

Término	Definición
pb	Par de bases
BA_Dil	Dilución del Bioanalyzer
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineación local básica
cfDNA	ADN libre circulante
CI	Intervalo de confianza
CSLI	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio
COSMIC	Catálogo de Mutaciones Somáticas en el Cáncer
ctDNA	ADN tumoral circulante
CV	Coeficiente de variación
dbSNP	Base de datos de polimorfismo de nucleótido único
dNTP	Trifosfato desoxirribonucleótido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EB	Tampón de elución
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EtOH	Etanol
gDNA	ADN genómico
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
HMW	Alto peso molecular
IDX	Índice
IFU	Instrucciones de uso
LoD	Límite de detección
MAF	Fracción alélica mutada

## 12 Glosario y terminología

---

Término	Definición
MM	Moléculas mutantes
Mpx	Mezcla de cebadores multiplex
NaOH	Hidróxido de sodio
NGS	Secuenciación de última generación
NTC	Control negativo
PC	Control positivo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
CC	Control de calidad
ARN	Ácido ribonucleico
SNV	Variante de nucleótido único
UID	Identificador único

## 13 Bibliografía

- 1) Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12. Erratum in: *CA Cancer J Clin.* 2020 Jul;70(4):313. PMID: 30207593.
- 2) Moo TA, Sanford R, Dang C, Morrow M. Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clin.* 2018 Jul;13(3):339-354. doi: 10.1016/j.cpet.2018.02.006. PMID: 30100074; PMCID: PMC6092031.
- 3) Stewart CM, Kothari PD, Mouliere F, Mair R, Somnay S, Benayed R, Zehir A, Weigelt B, Dawson SJ, Arcila ME, Berger MF, Tsui DW. The value of cell-free DNA for molecular pathology. *J Pathol.* 2018 Apr;244(5):616-627. doi: 10.1002/path.5048. Epub 2018 Mar 12. PMID: 29380875; PMCID: PMC6656375.
- 4) Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jun 7;108(23):9530-5. doi: 10.1073/pnas.1105422108. Epub 2011 May 17. PMID: 21586637; PMCID: PMC3111315.
- 5) Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif.* 2019 Mar 18;17:100087. doi: 10.1016/j.bdq.2019.100087. PMID: 30923679; PMCID: PMC6425120.
- 6) Fiste O, Lontos M, Koutsoukos K, Terpos E, Dimopoulos MA, Zagouri F. Circulating tumor DNA-based predictive biomarkers in breast cancer clinical trials: a narrative review. *Ann Transl Med.* 2020 Dec;8(23):1603. doi: 10.21037/atm-20-1175. PMID: 33437802; PMCID: PMC7791253.
- 7) [Online] <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.
- 8) Keup C, Benyaa K, Hauch S, Sprenger-Haussels M, Tewes M, Mach P, Bittner AK, Kimmig R, Hahn P, Kasimir-Bauer S. Targeted deep sequencing revealed variants in cell-free DNA of hormone receptor-positive metastatic breast cancer patients. *Cell Mol Life Sci.* 2020 Feb;77(3):497-509. doi: 10.1007/s00018-019-03189-z. Epub 2019 Jun 28. PMID: 31254045; PMCID: PMC7010653.
- 9) Fribbens C, Garcia Murillas I, Beaney M, Hrebien S, O'Leary B, Kilburn L, Howarth K, Epstein M, Green E, Rosenfeld N, Ring A, Johnston S, Turner N. Tracking evolution of aromatase inhibitor resistance with circulating tumour DNA analysis in metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2018 Jan 1;29(1):145-153. doi: 10.1093/annonc/mdx483. PMID: 29045530; PMCID: PMC6264798.

### 14 Copyrights y marcas comerciales

Queda prohibida la reproducción no autorizada del contenido de este manual, total o parcialmente, sin la autorización previa por escrito de Sysmex Corporation, Japón.

Plasma-SeqSensei™ es una marca comercial de Sysmex Corporation, Japón.

Todas las demás marcas comerciales, nombres y productos son, aunque no estén específicamente marcados como tales, marcas comerciales o marcas registradas de sus respectivos propietarios.



## 15 Historial de revisiones

Versión de documento	Fecha	Descripción del cambio	Sección
R3	Diciembre 2023	Actualización de las notas sobre la SNR y el CV durante el uso del Bioanalyzer.	9.5
R2	Noviembre 2023	Actualización de los límites de detección para las mutaciones de la línea germinal.	6
		Información sobre la notificación de la cobertura incompleta de los codones codificadores de aminoácidos.	6
		Reducción del límite superior de la temperatura del laboratorio y especificación de la temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C).	8.2 9
		Actualización del enlace de descarga de las instrucciones de uso y la ficha de datos de seguridad (FDS).	8.3 10
		Inclusión del número mínimo de muestras por cada High Output Kit.	9
		Actualización de la recomendación de dilución de las muestras y la cuantificación con Qubit™.	9.1
		Información sobre la manipulación de beads magnéticas AMPure.	9.2 9.2 paso 15 9.4 paso 7
		Inclusión de información ampliada sobre la desnaturalización, dilución y secuenciación de las muestras.	9.6 pasos 5-12
		Adición de información sobre la caracterización del rendimiento.	11.1 11.6 11.7
		Adición de la tabla «Historial de revisiones».	15
		Pequeñas correcciones, ortografía, diseño y cambios de orden.	
R1	Junio 2022	N/A	







Diciembre 2023  
ZR150547.R3

Sysmex Inostics GmbH  
Falkenried 88  
20251 Hamburg, Alemania  
[www.sysmex-inostics.com](http://www.sysmex-inostics.com)

© 2023 Sysmex Inostics  
Todos los derechos  
reservados.

