



SarcomaFusion



ESPAÑOL

Instrucciones de utilización GENEXPATH SarcomaFusion.

Precauciones de uso.



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro* según con la Directiva (UE) 98/79/CE
Para diagnóstico *in vitro*.

Exclusivamente para uso profesional.

Lea toda la información contenida en estas instrucciones antes de su uso.

Información de contacto:

Fabricante: GENEXPATH

+33 (0)2.78.08.98.69

113 avenue des Martyrs de la Résistance

76100 Rouen - Francia

contact@genexpath.com

support@genexpath.com



Precauciones importantes	5
Recomendaciones generales.....	5
Pictogramas.....	5
Uso previsto	6
Principio de la prueba	6
Reactivos	7
Contenido del kit de reactivos GENEXPATH SarcomaFusion	7
Formato de los kits de reactivos comercializados y cantidades	8
Reactivos no suministrados en el kit de reactivos	8
Material necesario.....	9
Antes de empezar	9
Muestras biológicas.....	9
Programación de los termocicladores.....	10
Programa 1:post-PCR.....	10
Programa 2: PCR.....	11
Protocolo detallado	11
Etapa 1: Transcripción inversa	11
Reactivos necesarios.....	11
Transcripción inversa.....	11
Etapa 2: Hibridación de las sondas	12
Reactivos necesarios.....	12
Hibridación de las sondas	12
Etapa 3: Ligación	13
Reactivos necesarios.....	13
Ligación	13
Etapa 4: Amplificación e incorporación de códigos de barras y adaptadores	14
Reactivos necesarios.....	14
Amplificación	14
Etapa 5: Purificación y análisis de las bibliotecas de secuenciación	15
Reactivos necesarios.....	15

Etapa 5.a: Purificación de las bibliotecas de secuenciación.....	15
Etapa 5.b: Análisis de las bibliotecas de secuenciación	15
Etapa 6: Dilución, pool y secuenciación de las bibliotecas	15
Reactivos necesarios.....	16
Secuenciación en un secuenciador Illumina MiSeq.....	16
Etapa 6.a: Dilución y pool de las bibliotecas	16
Etapa 6.b: Desnaturalización y dilución del pool de bibliotecas.....	16
Etapa 6.c: Preparación de los cebadores de secuenciación.....	16
Etapa 6.d: Preparación de la hoja de inyección	17
Etapa 6.e: Lanzamiento de la secuenciación.....	17
Secuenciación en una plataforma Illumina NextSeq 500/550	17
Etapa 6.a: Dilución y pool de las bibliotecas	17
Etapa 6.b: Desnaturalización y dilución del pool de bibliotecas.....	18
Etapa 6.c: Preparación de los cebadores de secuenciación.....	18
Etapa 6.d: Preparación de la hoja de inyección	18
Etapa 6.e: Lanzamiento de la secuenciación.....	18
Etapa 7: Análisis de los resultados	19
Limitaciones del procedimiento.....	19
Caracterización de las prestaciones.....	20
Prestaciones analíticas	20
Tabla 1: Resumen de los resultados previstos	20
Rendimiento analítico en una cohorte de pacientes	21
Repetibilidad.....	21
Repetibilidad intra-run	21
Repetibilidad intra-run	22
Repetibilidad	23
Sensibilidad analítica.....	23
Bibliografía	24
Tabla de símbolos	25
Notas.....	25

Precauciones importantes.

Recomendaciones generales.

- Se puede utilizar para diagnóstico *in vitro*
- Respete las buenas prácticas de laboratorio al manipular los productos destinados a la PCR (llevar bata y guantes desechables, establecer zonas específicas previas y posteriores a la PCR, utilizar filtros cónicos).
- Tome asimismo precauciones para evitar la contaminación con nucleasas, que pueden causar la degradación del ARN y el ADN (utilizar consumibles y reactivos libres de nucleasas).
- Asegúrese de que los termocicladores estén en buen estado de funcionamiento y que se hayan calibrado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
- Es especialmente importante no sustituir los reactivos no suministrados en el kit, especialmente los tampones y las enzimas utilizadas en los pasos de transcripción inversa, ligación y amplificación por PCR. También deben respetarse los tiempos y las temperaturas de incubación, así como los volúmenes y las concentraciones.
- El kit de prueba **SarcomaFusion** contiene un control positivo interno de GAPDH. Se recomienda encarecidamente que lo haga para validar que su experimento se ha realizado correctamente.
- Los reactivos **GENEXPATH SarcomaFusion** están destinados a su uso exclusivamente en las plataformas de secuenciación Illumina Miseq o Nextseq 500/550.
- Las fichas de datos de seguridad están disponibles en el espacio de usuarios.
- Si el usuario detecta errores en las instrucciones proporcionadas: envíe un correo electrónico a contact@genexpath.com.
- Cualquier incidente grave en relación con el dispositivo debe ser notificado a nosotros en la dirección / Cualquier incidente grave relacionado con el producto debe notificarse a contact@genexpath.com.

Pictogramas



Puntos importantes y etapas vitales del protocolo que pueden comprometer la calidad de los resultados.



Etapas en las que se puede suspender el protocolo.

Uso previsto

Este protocolo está destinado a la realización de la prueba **GENEXPATH SarcomaFusion**. Se utiliza para preparar bibliotecas de secuenciación para los secuenciadores Illumina MiSeq o NextSeq 500/550.

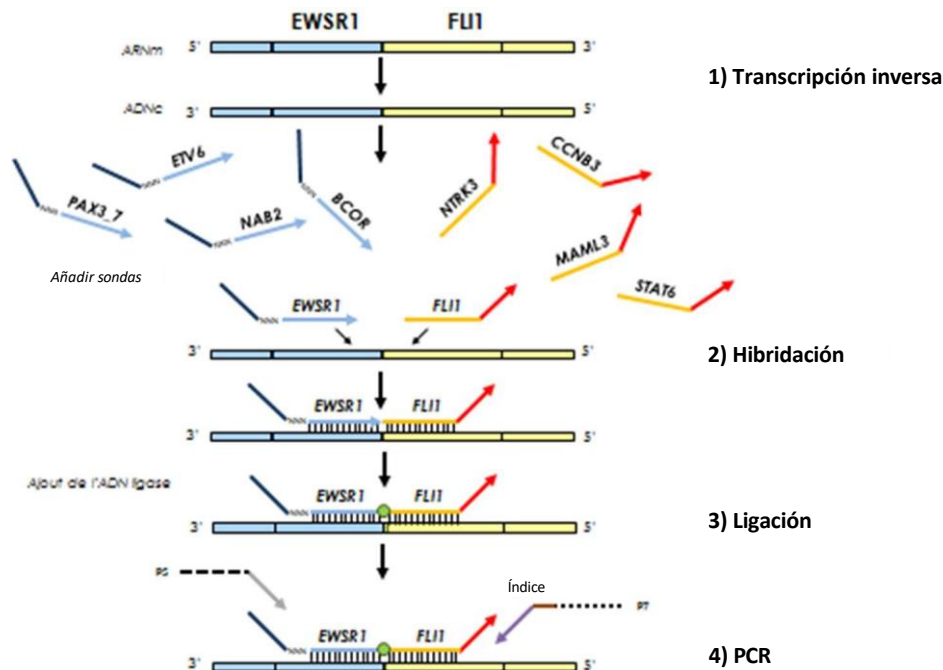
Los archivos fastQ generados mediante esta prueba contienen datos de recuento de secuencias correspondientes a la posible presencia de un transcrito de fusión; es decir, la ligación de dos sondas y su amplificación.

Pueden analizarse mediante el *software* **GENEXPATH RT-MIS**, que alberga una aplicación específica de demultiplexación de secuencias.

Esta prueba permite detectar los transcritos de fusión que se encuentran en 58 tipos de tumores de huesos y tejidos blandos mediante el estudio de 138 genes.

Principio de la prueba.

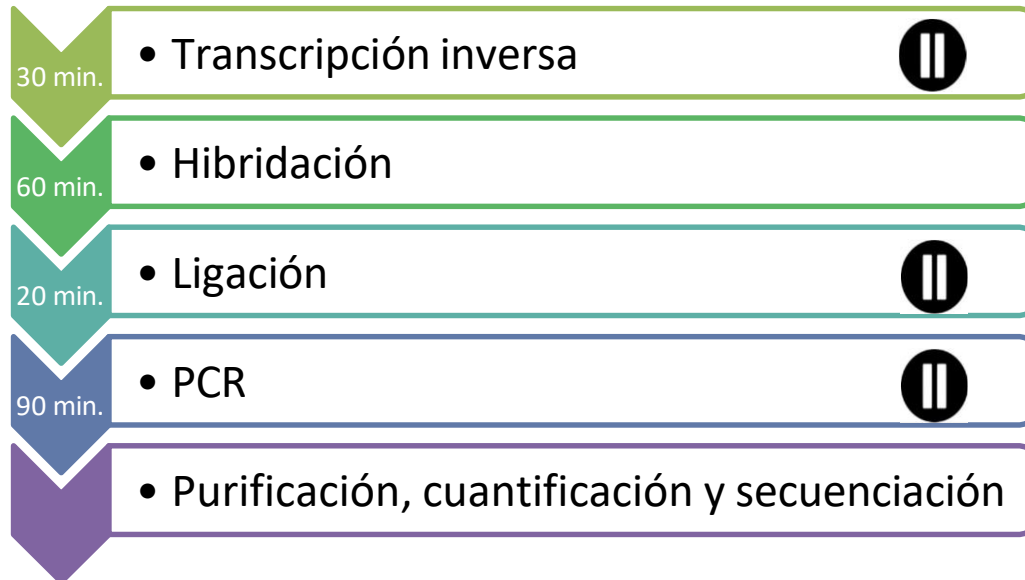
La prueba **GENEXPATH SarcomaFusion** se basa en un método de RT-PCR dependiente de la ligación (LD-RT-PCR). Esta técnica semicuantitativa permite detectar translocaciones cromosómicas utilizando pares de sondas de oligonucleótidos específicos. Se incluye un par de sondas para un gen de control (GAPDH) en la mezcla de sondas de la prueba para proporcionar un control interno para la prueba.



A partir de un extracto de ARN total, bastan cuatro etapas para obtener las bibliotecas.

- Una etapa de transcripción inversa (RT, por sus siglas en inglés).

- Una etapa de hibridación de sondas oligonucleótidas específicas.
- Una etapa de ligación.
- Una etapa de amplificación mediante PCR.



No se requiere ninguna purificación hasta la obtención de las bibliotecas, lo que limita la pérdida de material y garantiza una muy buena sensibilidad de esta técnica. Asimismo, las secuencias genéticas a las que se dirigen las sondas son especialmente cortas (entre 40 y 60 bases), lo que garantiza una gran solidez frente a la degradación del ARN.

Por tanto, la LD-RT-PCR es un enfoque particularmente adecuado para el análisis de muestras biológicas difíciles, como las biopsias de tejido fijadas e incluidas en parafina.

Para cada muestra, aproximadamente 10^5 secuencias son suficientes para obtener un perfil de expresión analizable, lo que permite analizar un gran número de muestras en paralelo en una única celda de flujo de secuenciación. Las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** también pueden cargarse junto con otras bibliotecas de secuenciación generadas por otros métodos.

Reactivos.

Contenido del kit de reactivos GENEXPATH SarcomaFusion

Mezcla de sondas GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-SFPM
Códigos de barras GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-BC-xxx
Cebador de secuencia GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-SP-001

Códigos de barras GAPDH GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-BCC-xxx

XXX: número de código de barras

Una vez recibidos, estos reactivos deben conservarse a una temperatura entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Estos están listos para su uso y no es necesario diluirlos.

La vida útil de los reactivos es de 1 año.

Vuelva a las condiciones de almacenamiento inmediatamente después de su uso.

No utilice reactivos después de la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta.

Formato de los kits de reactivos comercializados y cantidades:

	Kit de reactivos - U = número de análisis			
	8U	16U	24U	48U
Mezcla de sondas GEP-SFPM	30 μL	48 μL	54 μL	108 μL
Códigos de barras GEP-BC-xxx (de 001 a 032 según el número de análisis adquiridos) BC=código de barras	8 BC	8 BC	12 BC	24 BC
	N.º 017 a 024	N.º 001 a 008	N.º 021 a 032	N.º 001 a 024
	5 $\mu\text{L}/\text{BC}$	9 $\mu\text{L}/\text{BC}$	9 $\mu\text{L}/\text{BC}$	9 $\mu\text{L}/\text{BC}$
Cebadores de secuencia GEP-SP-001	60 μL	96 μL	144 μL	288 μL
Para el control interno				
Códigos de barras GAPDH GEP-BCC-xxx (de 001 a 032 según el número de análisis adquiridos) BCC=código de barras de control	8 BCC	8 BCC	12 BCC	24 BCC
	N.º 017 a 024	N.º 001 a 008	N.º 021 a 032	N.º 001 a 024
	5 $\mu\text{L}/\text{BCC}$	9 $\mu\text{L}/\text{BCC}$	9 $\mu\text{L}/\text{BCC}$	9 $\mu\text{L}/\text{BCC}$
Cebadores de secuencia GAPDH GEP-SP-002	60 μL	96 μL	144 μL	288 μL

Los reactivos se suministran en cantidades mayores de las que se necesitan realmente. Después del número de análisis solicitados, deben descartarse. Si se realiza un nuevo pedido, los reactivos se entregarán en consecuencia.

Para un kit de reactivos con más de 8 análisis, cada código de barras debe utilizarse para 2 análisis diferentes.

Reactivos no suministrados en el kit de reactivos:

Reactivos	Proveedores y referencias
SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, ref. 11754250
SALSA MLPA Buffer	MRC Holland, ref. SMR33
SALSA Ligase Buffer A	MRC Holland, ref. SMR12

SALSA Ligase Buffer B	MRC Holland, ref. SMR13
SALSA Ligase 65	MRC Holland, ref. SMR20
Red'y' Star PCR Mix	Eurogentec, ref. PK-0073-02R
AMPure XP (marmoles magnéticas)	Beckman Coulter, ref. A63880
Qubit® dsDNA HS Assay	Fisher Scientific, ref. 10616763
Reactivos de secuenciación	Illumina
Tampón TE (10 mM Tris-Acetate pH 8.0, 1 mM EDTA)	Variable
Etanol 100 %	Variable
NaOH 1 N	Variable
Tris Buffer 200 mM pH 7	Variable
Nuclease free agua	Variable

Una vez recibidos y entre usos, estos reactivos deben almacenarse según las recomendaciones de los distintos proveedores.

Material necesario:

Material	Proveedores y referencias
Termociclador en la zona pre-PCR	Variable
Termociclador en la zona post-PCR	Variable
Qubit® Fluorometer (o equivalente)	Thermo Fisher Scientific, ref. Q33238
Qubit® Assay Tubes	Fisher Scientific, ref. 12037609
DynaMag™-96 Side Magnet - Placa magnética (purificación AMPure XP)	Thermo Fisher Scientific, ref. 12331D
Tubos y placas de PCR de 200 µL	Variable

Antes de empezar.

Muestras biológicas.

La prueba **GENEXPATH SarcomaFusion** se utiliza para preparar bibliotecas de secuenciación a partir de ARN total extraído de tejidos o biopsias tumorales de sarcomas (tumores de huesos y tejidos blandos).

Estas muestras pueden ser frescas, congeladas o fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE).

Para la extracción de ARN de tejidos fijados, se recomienda utilizar el kit Promega Maxwell® RSC RNA FFPE (Promega, ref. AS1440 y AS4500).

La cantidad de ARN para analizar debe estar entre **50 y 500 ng, en un volumen de 2,5 µL**. Si la concentración de las soluciones para analizar es demasiado alta, estos ARN pueden diluirse con agua Nuclease free.

Programación de los termocicladores.

Para limitar el riesgo de contaminación, utilice dos termocicladores, uno en la zona pre-PCR y otro en la zona post-PCR.

Se necesitan dos programas:

- El primero permite realizar las tres primeras etapas del protocolo: **transcripción inversa del ARN en ADNc, hibridación de las sondas de oligonucleótidos y ligación**. Debe realizarse en el termociclador situado en la zona pre-PCR.
- El segundo se utiliza para amplificar los productos de ligación e incorporar los códigos de barras y adaptadores necesarios para la secuenciación. Debe realizarse en el termociclador situado en la zona post-PCR.

Programa 1:post-PCR.



Dado que los volúmenes de reacción son limitados, asegúrese de que la tapa calefactora del termociclador se mantenga a una temperatura elevada (95 °C) en todas las etapas del programa para evitar la evaporación.

Se prevén pausas a 4 °C o 54 °C entre las diferentes etapas del programa para permitir la adición de los reactivos necesarios.

Etapas 1: Transcripción inversa del ARN en ADNc.

- Tapa calefactora: 95 °C
- 10 minutos a 25 °C
- 60 minutos a 42 °C
- 5 minutos a 85 °C
- 4°C infinito

Etapas 2: Hibridación de las sondas.

- Tapa calefactora: 95 °C
- 2 minutos a 95 °C
- 60 °C infinito (1 h de hibridación)

Etapas 3: Ligación.

- Tapa calefactora: 95 °C
- 54 °C infinito (distribución de la mezcla de ligación)

- 15 minutos a 54 °C
- 5 minutos a 98 °C
- 4°C infinito

Programa 2: PCR.

- Tapa calefactora: 95 °C
- 6 minutos a 94 °C
- 35 x (30 segundos a 94 °C; 30 segundos a 58 °C; 30 segundos a 72 °C)
- 4 minutos a 72 °C
- 4°C infinito

Protocolo detallado.

Etapa 1: Transcripción inversa.

Esta etapa debe realizarse en la zona pre-PCR.

Reactivos necesarios.

- 5X Vilo reaction mix, 10X super script (SuperScript Vilo cDNA Synthesis Kit), agua Nuclease free, extracto de ARN total para análisis (25 a 250 ng/μL).



Se recomienda realizar todo el procedimiento en tubos o placas de PCR de 200 μL.

Transcripción inversa.

- Descongele los siguientes reactivos y consérvelos en hielo o en un soporte de refrigeración: 5X Vilo reaction mix y 10X super script.
- Prepare una mezcla de transcripción inversa. Para cada muestra, mezcle (para un volumen total de 3 μL por reacción) :
 - 5X Vilo reaction mix 1 μL
 - Nuclease free agua 1 μL
 - 10X super script 0,5 μL
- Dispense esta mezcla en tubos de PCR de 200 μL (2,5 μL por tubo) mantenidos en hielo o en un soporte de refrigeración.
- Añada 2,5 μL de cada una de las soluciones de ARN total a los distintos tubos.
- Agite en el vórtex y centrifugue brevemente.
- Coloque los tubos en el termociclador situado en la zona pre-PCR y proceda con la **etapa 1 del programa pre-PCR** (transcripción inversa de ARN a ADNc).



A continuación, proceda directamente a la etapa 2 o conserve los productos de ligación a una temperatura entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Etapa 2: Hibridación de las sondas.

Esta etapa debe realizarse en la zona pre-PCR.

Reactivos necesarios.

- Mezcla de sondas **GENEXPATH SarcomaFusion** GEP- SFPM), SALSA MLPA Buffer

Hibridación de las sondas.

- **Al final de la etapa 1**, cuando la temperatura del termociclador haya descendido a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, retire los tubos, centrifúgelos brevemente y colóquelos en hielo o en un soporte de refrigeración.
- Descongele el tampón Salsa MLPA Buffer y la mezcla de sondas **GENEXPATH SarcomaFusion** y consérvelos en hielo o en un soporte de refrigeración.
- Prepare una mezcla de hibridación. Para cada muestra, mezcle (para un volumen total de $3\text{ }\mu\text{L}$ por reacción) :

○ Salsa MLPA Buffer	1,5 μL
○ Mezcla de sondas GENEXPATH SarcomaFusion	1,5 μL
- Agite en el vórtex y centrifugue brevemente.
- Añada $3\text{ }\mu\text{L}$ de esta mezcla a cada tubo de ADNc.
- Centrifugue brevemente.
- Vuelva a colocar los tubos en el termociclador.
- Compruebe la temperatura de la tapa calefactora ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Proceda a la **etapa 2 del programa pre-PCR** (hibridación de las sondas).

Etapa 3: Ligación.

Esta etapa debe realizarse en la zona pre-PCR.

Reactivos necesarios.

- SALSA Ligase Buffer A, SALSA Ligase Buffer B, SALSA Ligase 65, Nuclease free agua.

Ligación.

- 15 minutos antes del final de la etapa 2, descongele los tampones SALSA Ligase Buffer A y SALSA Ligase Buffer B y consérvelos en hielo o en un soporte de refrigeración.
- Coloque la enzima SALSA Ligase 65 en hielo o en un soporte de refrigeración.
- Prepare una mezcla de ligación. Para cada muestra, mezcle (para un volumen total de 32 μ L por reacción) :
 - o Nuclease free agua 25 μ L
 - o Salsa Ligase Buffer A 3 μ L
 - o Salsa Ligase Buffer B 3 μ L
- Agite en el vórtex y centrifugue brevemente
 - o Salsa Ligase 65 1 μ L
- Agite en el vórtex y centrifugue brevemente.
- Después de 60 minutos de incubación, proceda a la **etapa 3 del programa pre-PCR (ligación)**.
- Reduzca la temperatura del bloque calefactor a 54 °C.
- Añada 32 μ L de la mezcla de ligación directamente a cada tubo, sin sacarlos del bloque calefactor.
- Después de distribuir la mezcla, pase a la siguiente etapa del programa (15 minutos a 54 °C, 5 minutos a 98 °C).



Al final de esta etapa, cuando la temperatura del bloque de PCR haya descendido a 4 °C, proceda inmediatamente a la etapa 4 (amplificación por PCR) o congele los productos de ligación (hasta una temperatura entre -30 °C y -15 °C).



Después de esta etapa, no almacene los productos a temperaturas más altas (por ejemplo, 4 °C o temperatura ambiente) para evitar ligaciones no específicas que pudieran derivarse de la actividad enzimática residual.

Etapa 4: Amplificación e incorporación de códigos de barras y adaptadores.

En esta etapa, los productos de ligación se amplifican por PCR utilizando las colas adicionales en los extremos de las sondas. Estas amplificaciones se realizan utilizando los pares de cebadores proporcionados en los tubos de Código de barras **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BC-xxx).

Para permitir el análisis de múltiples muestras en una sola celda de flujo, el cebador de PCR 3' lleva un código de barras molecular que será reconocido por el algoritmo de demultiplexación de la plataforma **GENEXPATH RT-MIS**.

Para realizar el control interno con las sondas GAPDH, se realizan dos PCR diferentes, por lo que hay que duplicar el número de tubos. Para una muestra determinada, debe utilizarse el mismo número xxx de códigos de barras GEP-BC-xxx y GEP-BCC-xxx para el análisis informático. Por tanto, para cada muestra, debe añadirse el código de barras GEP-BC-xxx a un tubo y el código de barras GEP-BCC-xxx asociado al otro.

Reactivos necesarios.

- Códigos de barras **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BC-xxx), Códigos de barras GAPDH **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BCC-xxx), Red'y' Star PCR Mix, agua Nuclease free.

Amplificación.

- Prepare una mezcla de amplificación en la zona pre-PCR. Para cada muestra, mezcle (para un volumen total de 18 μ L por reacción) :
 - o Red'y' Star PCR Mix 12,5 μ L
 - o Agua Nuclease free 5,5 μ L
- Agite en el vórtex y centrifugue brevemente.
- Dispense 18 μ L de esta mezcla de amplificación en diferentes pocillos de una placa de PCR.
- Añada 5 μ L de los productos de ligación generados en la etapa 3 a cada pocillo.
- Añada 2 μ L de Código de barras **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BC-xxx o GEP-BCC-xxx, según la prueba).



Utilice diferentes códigos de barras GEP-BC-xxx para cada una de las muestras analizadas, pero para una misma muestra utilice el mismo número para GEP-BC-xxx y GEP-BCC-xxx.

- Coloque la placa en el termociclador en la zona post-PCR.
- Inicie el **programa 2** (PCR).



Al final del programa, cuando la temperatura del termociclador haya descendido a 4 °C, proceda rápidamente a la etapa 5 (purificación) o congele los productos de amplificación a una temperatura entre -30 °C y -15 °C.



No conserve estos productos durante periodos prolongados a temperaturas más altas (por ejemplo, a 4 °C en el termociclador o a temperatura ambiente).

Etapa 5: Purificación y análisis de las bibliotecas de secuenciación.

Tras la etapa de amplificación, las bibliotecas de secuenciación deben purificarse para eliminar los cebadores de la PCR y los nucleótidos no incorporados. Esta purificación se realiza con marmoles magnéticas AMPure XP. A continuación, las bibliotecas deben analizarse por fluorimetría con el kit Qubit® dsDNA HS antes de cargarlas en el secuenciador.

Reactivos necesarios.

- Etanol 100 %, Nuclease free agua, marmoles AMPure XP, tampón TE (10 mM de Tris-acetato pH 8,0, 1 mM de EDTA), Qubit® dsDNA HS Assay.

Etapa 5.a: Purificación de las bibliotecas de secuenciación.



Asegúrese de que las marmoles estén completamente resuspendidas antes de su uso.

- Purificar 25 µL de productos de PCR con 45 µL de marmoles AMPure XP (siguiendo las recomendaciones del proveedor).
- Eluir los productos de PCR purificados en 50 µL de tampón TE.



Tras la purificación, las bibliotecas pueden conservarse a una temperatura entre -30 °C y -15 °C antes de la secuenciación.

Etapa 5.b: Análisis de las bibliotecas de secuenciación.

- Analice 10 µL de cada biblioteca de secuenciación por fluorimetría con el producto Qubit® dsDNA HS Assay.

Etapa 6: Dilución, pool y secuenciación de las bibliotecas.

Tras la purificación, las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** deben diluirse, agruparse y cargarse en el secuenciador.



Para obtener resultados óptimos, debe leerse un mínimo de 10⁵ secuencias para cada muestra.

A diferencia de la mayoría de las bibliotecas de secuenciación convencionales, la read de los códigos de barras moleculares necesarios para demultiplexar las secuencias de **GENEXPATH SarcomaFusion** se realizan durante la read1. Por tanto, estas secuencias no se demultiplexan



automáticamente por el secuenciador y se guardarán en los archivos fastQ «Undetermined». La demultiplexación se realiza mediante el algoritmo específico proporcionado en la plataforma **GENEXPATH RT-MIS**.

Reactivos necesarios.

- Cebador de secuenciación **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001), cebadores de secuenciación de control **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-002) (si se realiza un control interno), reactivos de secuenciación Illumina

Secuenciación en un secuenciador Illumina MiSeq.

Para obtener información detallada sobre la dilución y desnaturalización de las bibliotecas, la preparación del cebador de secuencia, la hoja de inyección y el inicio de la secuenciación, consulte la Guía del sistema Miseq de Illumina.

- **Etapa 6.a: Dilución y pool de las bibliotecas.**
- Diluya cada una de las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** a una concentración entre 2 nM y 4 nM, asumiendo un tamaño medio de fragmentos amplificados de 150 pb.
- Agrupe las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** en un volumen equivalente.
- Si se secuencian otras bibliotecas en la misma celda de flujo, ajuste las concentraciones de los diferentes pools y combínelas posteriormente para obtener el número deseado de secuencias (un mínimo de 10^5 secuencias para cada biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion**).

Por ejemplo: para un pool de 10 bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** que requieran 1 M de secuencias (10^5 secuencias para cada biblioteca), secuenciadas con un pool de bibliotecas B a la misma concentración y que requieran 3 M de secuencias, mezcle 1 μ L del pool de bibliotecas **GENEXPATH Sarcoma Fusion** y 3 μ L del pool de bibliotecas B.

- **Etapa 6.b: Desnaturalización y dilución del pool de bibliotecas.**
- Desnaturalice y diluya el pool final según las recomendaciones de la Guía del Sistema Miseq de Illumina hasta alcanzar una concentración de carga final de 8-10 pM.
- **Etapa 6.c: Preparación de los cebadores de secuenciación.**
- Si el pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** se secuencia solo, diluya 3 μ L de cada cebador de secuenciación **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 y GEP-SP-002, si se trata de un control interno) en un volumen final de 600 μ L de tampón HT1 y, a continuación, coloque estos 600 μ L en el pocillo 18 del cartucho de reactivos del sistema MiSeq.

- Si el pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** está cargado con otras bibliotecas secuenciadas con cebadores de secuenciación Illumina, traslade con una pipeta todo el contenido del pocillo 12 (aproximadamente 600 µL), añada 3 µL de cada cebador de secuenciación **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 y GEP-SP-002, si es un control interno) y vuelva a dispensar esta mezcla en el pocillo 18 del cartucho.
 - [Etapa 6.d: Preparación de la hoja de inyección.](#)
- Si la biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion** se secuencia sola, realice la hoja de inyección para generar los FASTQ con 120 ciclos en la read1.
- Si las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** se combinan con otras bibliotecas de secuenciación, genere la hoja de inyección utilizando los parámetros habituales, sin introducir las muestras **GENEXPATH SarcomaFusion**.
- Especifique el uso de un cebador personalizado al configurar la serie (con «Local Run Manager», en la página «Create Run»). En el modo de ejecución manual, en la pantalla «Run Setup»).



En todos los casos, asegúrese de que la read 1 se realice con un mínimo de 120 ciclos y que se seleccione la casilla «Custom Primer for Read 1».

- En todos los casos, las secuencias de las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** no se demultiplexarán por el secuenciador, sino que se guardarán en el archivo FastQ «Undetermined», que deberá cargarse en la plataforma **GENEXPATH RT-MIS**.
 - [Etapa 6.e: Lanzamiento de la secuenciación.](#)
- Inicie la secuenciación tal como se indica en la Guía del sistema MiSeq de Illumina.

Secuenciación en una plataforma Illumina NextSeq 500/550.

Para obtener información detallada sobre la dilución y desnaturalización de las bibliotecas, la preparación del cebador de secuencia, la hoja de inyección y el inicio de la secuenciación, consulte la Guía del sistema NextSeq de Illumina.

- [Etapa 6.a: Dilución y pool de las bibliotecas.](#)
- Diluya cada una de las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** a una concentración entre 0,5 nM y 4 nM, asumiendo un tamaño medio de fragmentos amplificados de 150 pb.
- Agrupe las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** en un volumen equivalente.
- Si se secuencian otras bibliotecas en la misma Flowcell, ajuste las concentraciones de los diferentes pools y combínelas posteriormente para obtener el número deseado de secuencias (un mínimo de 10^5 secuencias para cada biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion**).

Por ejemplo: para un pool de 10 bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** que requieran 1 M de secuencias (10^5 secuencias para cada biblioteca), secuenciadas con un pool de bibliotecas B a la misma concentración y que requieran 3M de secuencias, mezcle 1 μL del pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** y 3 μL del pool de bibliotecas B.

- [Etapa 6.b: Desnaturalización y dilución del pool de bibliotecas.](#)
- Desnaturalice y diluya el pool final según las recomendaciones de la Guía del Sistema NextSeq de Illumina hasta una concentración de carga final de 0,8 pM a 1 pM.
 - [Etapa 6.c: Preparación de los cebadores de secuenciación.](#)
- Si el pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** se está secuenciando solo, diluya 6 μL de cada cebador de secuenciación **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 y GEP-SP002, si es un control interno) en un volumen final de 2000 μL de tampón HT1 y, a continuación, coloque estos 2 mL en el pocillo 7 del cartucho de reactivos del NextSeq.
- Si el pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** se combina con otras bibliotecas secuenciadas con cebadores de secuenciación Illumina, traslade con una pipeta todo el contenido del pocillo 20 (aproximadamente 2 mL), añada 6 μL de cada cebador de secuenciación **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 y GEP-SP-002, si es un control interno) y vuelva a dispensar esta mezcla en el pocillo 7 del cartucho.
 - [Etapa 6.d: Preparación de la hoja de inyección.](#)
- Si la biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion** se secuencia sola, realice la hoja de inyección para generar los FASTQ con 120 ciclos en la read 1.
- Si las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** se combinan con otras bibliotecas de secuenciación, genere la hoja de inyección utilizando los parámetros habituales, sin introducir las muestras **GENEXPATH SarcomaFusion**.
- Especifique el uso de un cebador personalizado al configurar la serie (con «Local Run Manager», en la página «Create Run»). En el modo de ejecución manual, en la pantalla «Run Setup»).



En todos los casos, asegúrese de que la read 1 se realice con un mínimo de 120 ciclos y que se seleccione la casilla «Custom Primer for Read 1».

- En todos los casos, las secuencias de las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** no se demultiplexarán por el secuenciador, sino que se guardarán en los cuatro archivos FastQ «Undetermined», que deberán cargarse en la plataforma **GENEXPATH RT-MIS**.
 - [Etapa 6.e: Lanzamiento de la secuenciación.](#)
- Inicie la secuenciación tal como se describe en la Guía del sistema NextSeq de Illumina.

Etapa 7: Análisis de los resultados.

Los archivos de secuencias generados por las plataformas de secuenciación Illumina (MiSeq o NextSeq) en formato FastQ deben analizarse con el *software* **GENEXPATH RT-MIS**, disponible *online* en <https://connect.genexpath.com/>.



Para facilitar la descarga del archivo FastQ, este no debe descomprimirse (fastq.gz).

Este *software* es una solución bioinformática completa que integra varios algoritmos de tratamiento de datos. Asimismo, realiza el demultiplexado que permite la asignación de secuencias a cada muestra. A continuación, realiza una identificación precisa de los marcadores de expresión génica y su cuantificación.

La prueba **GENEXPATH SarcomaFusion** se basa en la cuantificación de marcadores cualitativos que caracterizan la presencia o ausencia de translocaciones cromosómicas.

GENEXPATH RT-MIS genera informes concisos y transparentes, que abarcan desde la configuración de las reacciones de secuenciación hasta el análisis automatizado de sus resultados.

GENEXPATH RT-MIS requiere la carga de los archivos del secuenciador en formato FASTQ, así como la lista de códigos de barras utilizados en la prueba.

GENEXPATH RT-MIS evalúa la calidad de la secuenciación de cada muestra cuantificando el número de reads identificadas y el número de UMI (identificadores moleculares únicos, por sus siglas en inglés) detectados.

GENEXPATH RT-MIS genera un informe de análisis para cada muestra, en el que se indica la presencia o ausencia de un transcrito de fusión, el número de reads e UMI obtenidos y una referencia bibliográfica correspondiente al transcrito (en caso de que se haya detectado una fusión). Estos datos están disponibles para su descarga.

GENEXPATH RT-MIS incluye un manual de usuario que puede consultarse directamente *online* para facilitar el uso de la herramienta, describir todos los resultados generados y detallar su presentación.

GENEXPATH no almacena permanentemente los resultados generados por el *software* **GENEXPATH RT-MIS**. Los datos deben descargarse directamente después de cada análisis y almacenarse por el usuario en su sistema de gestión documental.

Limitaciones del procedimiento

- La prueba SarcomaFusion se desarrolló a partir de datos de la literatura para detectar las transcripciones de fusión más comunes en pacientes con sarcoma. Está diseñado para su uso en FFPE o muestras congeladas, posiblemente obtenidas de biopsias con aguja.

-Las prestaciones demostradas en el apartado «Caracterización de las prestaciones» se han validado con arreglo al procedimiento expuesto anteriormente.

-Una pequeña cantidad de ARN o una muestra de baja calidad pueden conducir a un resultado no interpretable.

-La secuenciación debe realizarse con secuenciadores de tecnología Illumina (Miseq y NextSeq).

Caracterización de las prestaciones

Prestaciones analíticas

Para demostrar las prestaciones analíticas de la prueba SarcomaFusion GENEXPATH, se evaluaron 4 ARN extraídos de muestras FFPE (3 positivas y 1 negativa) y 3 ARN extraídos de muestras congeladas (todos positivos) de pacientes con sarcoma y 2 líneas celulares (muestras negativas). Los resultados previstos se resumen en la Tabla 1. Tras el análisis con el *software* analítico RT-MIS, los resultados se obtuvieron según el procedimiento descrito en estas instrucciones de utilización y se resumen en la Tabla 2.

En virtud de estos resultados, la prueba SarcomaFusion proporciona una alta sensibilidad y especificidad para la detección de los transcritos de fusión asociados al sarcoma.

Tabla 1: Resumen de los resultados previstos

Muestra	Fusión esperada	Valores predictivos	
Muestra 1	EWSR1 exón 7 - CREB1 exón 7	Verdadero positivo (VP)	6
Muestra 2	JAZF1 exón 3 - SUZ12 exón 2	Verdadero negativo (VN)	3
Muestra 3	Muestra 3	Valor predictivo positivo (%)	100 %
Muestra 4	negativo	Exhaustividad (%)	100 %
Muestra 5	SS18 exón 10 - SSX exón 6	Tasa de falsos positivos (%)	0 %
Muestra 6	PAX3_7 exón 7 - FOXO exón 2	Sensibilidad (%)	100 %
Muestra 7	EWSR1 exón 7 - FLI1 exón 6	Falso positivo (FP)	0
Línea celular 1	negativo	Falso negativo (FN)	0

Línea celular 2	negativo	Valor predictivo negativo (%)	100 %
		Precisión (%)	100 %
		Tasa de falsos negativos (%)	0 %
		Especificidad (%)	100 %

Los resultados demuestran que la prueba SarcomaFusion proporciona una alta sensibilidad y especificidad para la detección de transcripciones de fusión asociadas con el sarcoma.

Rendimiento analítico en una cohorte de pacientes

Un estudio publicado en 2022 sobre 158 muestras de tumores óseos y tejidos blandos (Lanic MD et al., Modern Pathology, 2022) demostró las siguientes actuaciones:

Sensibilidad = 98,1 %

Especificidad = 100

En este artículo, los autores informan que las pocas anomalías no detectadas por la prueba SarcomaFusion se explican por:

- La presencia de translocaciones raras o complejas no cubiertas por la prueba SarcomaFusion
- La baja calidad y cantidad de ARN de algunas muestras

Repetibilidad

La repetibilidad de la prueba SarcomaFusion se define como su capacidad para cuantificar con precisión una transcripción de fusión esperada. Se realizaron dos pruebas:

- Una prueba para probar la repetibilidad de los resultados de 3 muestras dentro de la misma ejecución
- Un segundo para probar la repetibilidad de los resultados de 5 muestras en 3 series diferentes.

Repetibilidad intra-run

Se estudiaron 3 muestras analizadas en triplicata mediante el test SarcomaFusion (Figura 1). Los datos de conteo para cada anomalía según las réplicas son perfectamente comparables.

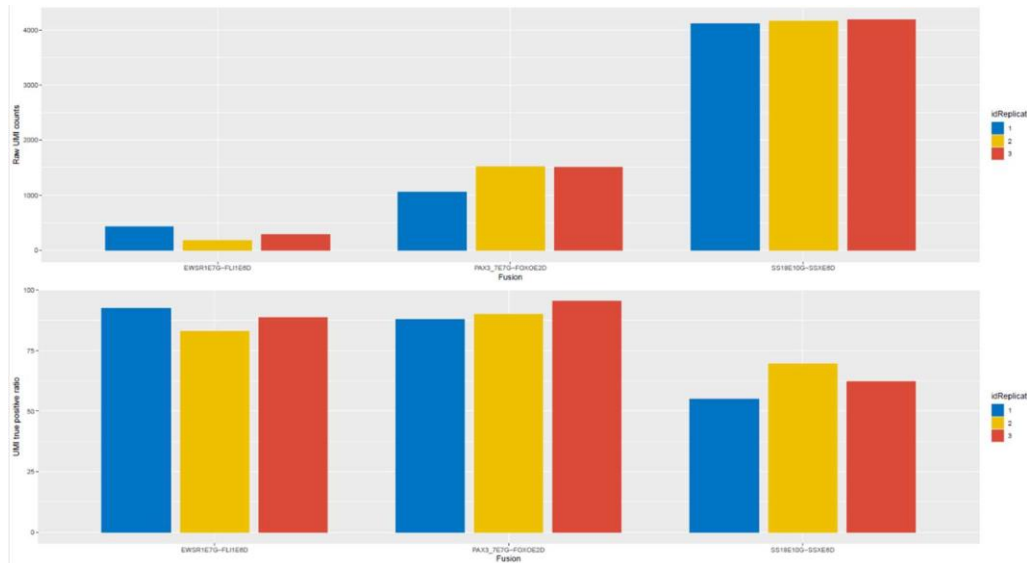


Figura 1: Los histogramas representan en la parte superior el número bruto de UMI detectados y en la parte inferior en relación con el número total de UMI en la muestra en función de la fusión esperada y las réplicas.

Repetibilidad intra-run

Se estudiaron 5 muestras analizadas por la prueba SarcomaFusion en 3 series diferentes (Figura 2). Los datos de recuento para cada anomalía son perfectamente comparables.

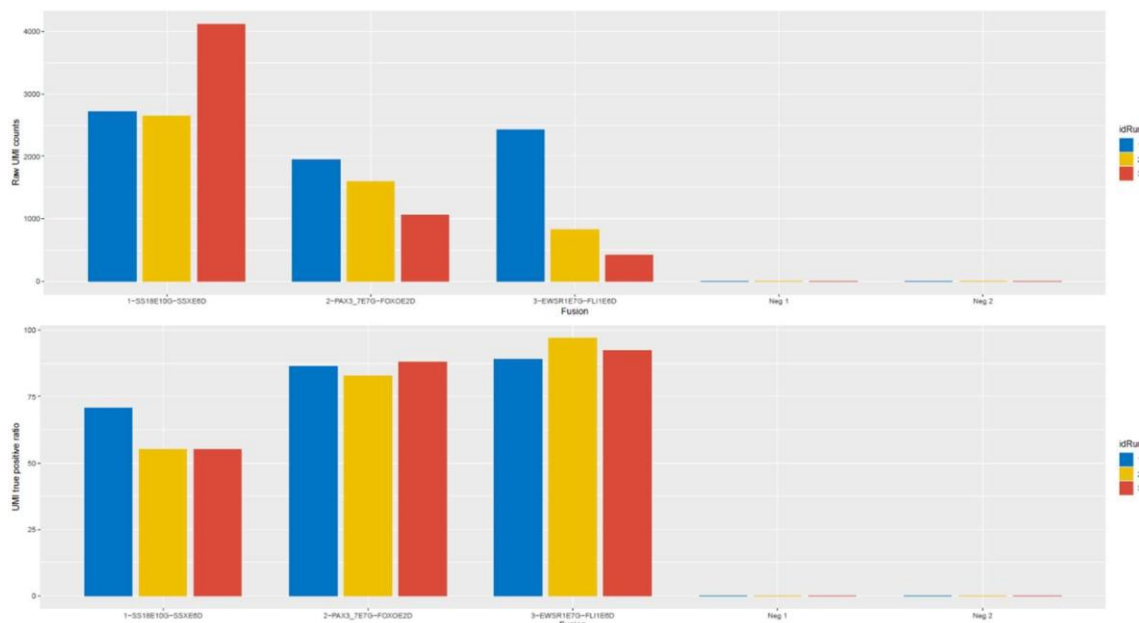


Figura 2: Los histogramas representan en la parte superior el número bruto de UMI detectados y en la parte inferior en relación con el número total de UMI en la muestra de acuerdo con la fusión y ejecución esperadas.

Repetibilidad

La reproducibilidad se refiere a la capacidad de la prueba SarcomaFusion para detectar translocaciones entre diferentes usuarios en condiciones idénticas.

Para evaluar este parámetro, se analizaron 5 muestras por 3 usuarios diferentes:

- 3 muestras positivas (SS18 exón 10 – exón SSX 6, PAX3_7 exón 7 – FOXO exón 2, EWSR1 exón 7 – FLI1 exón 6)
- 2 muestras negativas (líneas celulares)

Los datos, que se muestran en la Figura 3, muestran una cuantificación reproducible entre diferentes usuarios.

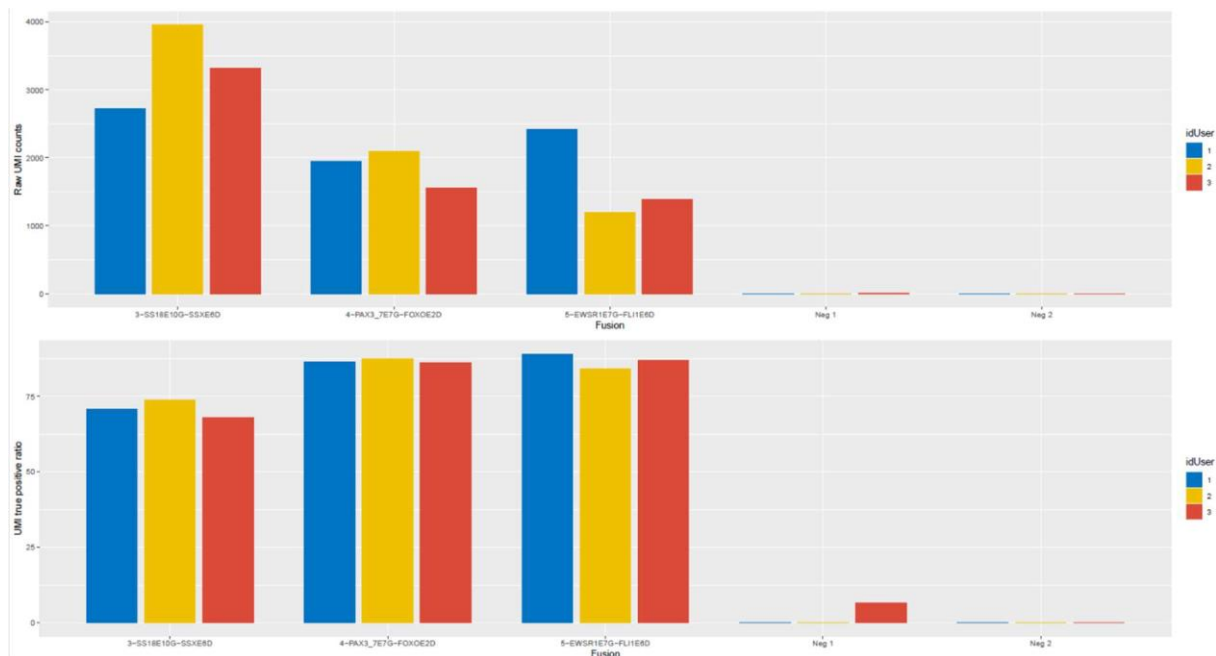


Figura 3: Los histogramas representan en la parte superior el número bruto de UMI detectada y en la parte inferior en relación con el número total de UMI en la muestra según la fusión esperada y el usuario.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del ensayo SarcomaFusion se define como su capacidad para detectar translocaciones en función de la cantidad de ARN en la muestra y el porcentaje de células tumorales en la muestra.

Para determinar estos dos límites de sensibilidad, se realizaron dos diluciones seriadas a partir de 2 muestras:

- Dilución en agua para simular una disminución del ARN
- Una dilución de la muestra que se analizará en ARN universal para simular una disminución en el enriquecimiento tumoral

Los resultados se muestran en la Figura 4. La dilución de dos muestras de control a cantidades iniciales de 529 y 489 ng de ARN en agua de nucleasa libre muestra que las fusiones esperadas todavía se detectan a cantidades de ARN de 4 ng. Incluso si la cuantificación de anomalías es una función del enriquecimiento tumoral de la muestra analizada, el límite obtenido está muy por debajo de las recomendaciones para el uso de la prueba SarcomaFusion (entre 50 y 500 ng).

El segundo rango de diluciones realizadas a partir de dos muestras positivas y ARN universal muestra que las anomalías esperadas siempre se detectan al 3% de la muestra tumoral. Con ARN positivo al 0%, la prueba ya no detecta ningún rastro de fusiones.

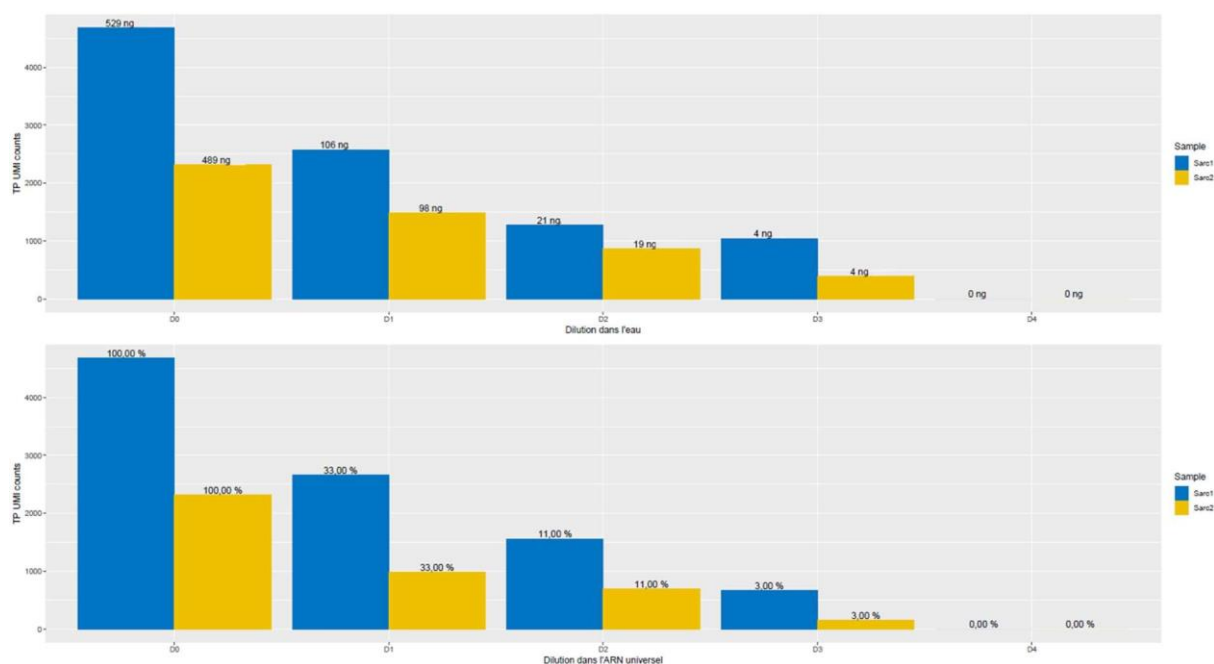











Figura 4: Los histogramas representan el número bruto de UMI detectados de fusiones esperadas en dos muestras basadas en rangos de dilución en agua (arriba) o ARN universal (abajo).

Bibliografía

Detection of sarcoma fusions by a next-generation sequencing based-ligation-dependent multiplex RT-PCR assay. Lanic MD et al., Mod Pathol 2022 (PMID : 35075283).

Tabla de símbolos

 Fabricante	 Nombre del reactivo
 Fecha de fabricación	 Límite de temperatura
 Fecha de caducidad	 Consulte las instrucciones de uso
 Código de lote	 Mercado CE - Conformidad europea
	 Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>

Notas

Los reactivos **GENEXPATH SarcomaFusion** están protegidos por derechos de propiedad intelectual, por lo que queda prohibida su modificación, reproducción, venta o transmisión sin la autorización del fabricante.

La información contenida en este documento está sujeta a cambios.