



**República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional**  
Las Malvinas son argentinas

**Disposición**

**Número:**

**Referencia:** EX-2021-114575734-APN-DGA#ANMAT

---

VISTO el N° EX-2021-114575734-APN-DGA#ANMAT del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma HEMOMEDICA S.R.L. solicita autorización para la venta de los Productos médicos para diagnóstico *in vitro* denominados **1) SR-850-00043 MIA FORA NGS FLEX Software. 2) SR-800-10534-24 MIA FORA NGS MFLEX 11 HLA Typing Kit. 3) SR-800-10534-96 MIA FORA NGS MFLEX 11 HLA Typing Kit. 4) SR-800-10534-1152 MIA FORA NGS MFLEX HT 11 HLA Typing Kit. 5) SR-800-10535-24 MIA FORA NGS MFLEX 6 HLA Typing Kit. 6) SR-800-10535-96 MIA FORA NGS MFLEX 6 HLA Typing Kit. 7) SR-800-10535-1152 MIA FORA NGS MFLEX HT 6 HLA Typing Kit .**

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establecen la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99. Que en el expediente de referencia consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos Médicos para Diagnóstico *in vitro* que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia y corresponde autorizar la inscripción en el RPPTM del producto médico para diagnóstico *in vitro* objeto de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por el Decreto N° 1490/92 y sus modificatorios.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE  
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA  
DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) de los productos médicos para diagnóstico *in vitro* denominados **1) SR-850-00043 MIA FORA NGS FLEX Software. 2) SR-800-10534-24 MIA FORA NGS MFLEX 11 HLA Typing Kit. 3) SR-800-10534-96 MIA FORA NGS MFLEX 11 HLA Typing Kit. 4) SR-800-10534-1152 MIA FORA NGS MFLEX HT 11 HLA Typing Kit. 5) SR-800-10535-24 MIA FORA NGS MFLEX 6 HLA Typing Kit. 6) SR-800-10535-96 MIA FORA NGS MFLEX 6 HLA Typing Kit. 7) SR-800-10535-1152 MIA FORA NGS MFLEX HT 6 HLA Typing Kit** de acuerdo con lo solicitado por la firma HEMOMEDICA S.R.L. con los datos identificatorios característicos que figuran al pie de la presente.

ARTÍCULO 2º.-Autorízase los textos de los proyectos de rótulos y de instrucciones de uso que obran en documento N° IF-2022-44556839-APN-INPM#ANMAT.

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda “Autorizado por la ANMAT PM-1049-66, con exclusión de toda otra leyenda no contemplada en la normativa vigente.

ARTÍCULO 4º.- Extiéndase el Certificado de Autorización e Inscripción en el RPPTM con los datos característicos mencionados en esta disposición.

ARTÍCULO 5º.- Regístrese. Inscríbase en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica a nuevo producto. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de uso autorizados y el Certificado mencionado en el artículo 4º. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.

#### DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

**NOMBRE COMERCIAL:** 1) SR-850-00043 MIA FORA NGS FLEX Software. 2) SR-800-10534-24 MIA FORA NGS MFLEX 11 HLA Typing Kit. 3) SR-800-10534-96 MIA FORA NGS MFLEX 11 HLA Typing Kit. 4) SR-800-10534-1152 MIA FORA NGS MFLEX HT 11 HLA Typing Kit. 5) SR-800-10535-24 MIA FORA NGS MFLEX 6 HLA Typing Kit. 6) SR-800-10535-96 MIA FORA NGS MFLEX 6 HLA Typing Kit. 7) SR-800-10535-1152 MIA FORA NGS MFLEX HT 6 HLA Typing Kit .

**INDICACIÓN DE USO:** 1. El software está diseñado para identificar correctamente los genotipos del HLA basándose en la secuencia de codificación. Se da una consideración especial a las regiones de exones con mayor grado de secuenciación, a saber, los exones 2 y 3 de los genes de clase I y el exón 2 de los genes de clase II. Por ahora, se ha hecho menos hincapié en la identificación de variantes de intrones. El software MIA FORA NGS ofrece una interfaz gráfica de usuario (GUI) intuitiva y cumple los requisitos establecidos por la comunidad del

HLA. Con este software, los usuarios disponen de en primer lugar, genotipos del HLA exactos y sin ambigüedades basados en la última nomenclatura del IMGT, en segundo lugar, la secuencia completa con fase ajustada cubierta por los cebadores objetivo utilizados para interrogar los genes del HLA. 2) Y 3) El Kit MIA FORA NGS MFlex 11 se ha concebido para la amplificación y secuenciación de los genes del HLA: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB-1/3/4/5, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DPA1 y HLADPB1 en la plataforma de secuenciación de la nueva generación de Illumina. El software MIA FORA se ha diseñado como guía para determinar el tipo HLA a partir de los datos que se hayan generado con el MIA FORA NGS MFlex 11 Library Prep Kit (kit 11 para preparación de bibliotecas). El ensayo se ha concebido para su uso en un laboratorio especializado y experto en la manipulación de ADN para su amplificación y secuenciación. 4) El Kit MIA FORA NGS MFlex 11 se ha concebido para la amplificación y secuenciación de los genes del HLA: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLADRB-1/3/4/5, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DPA1 y HLA-DPB1 en la plataforma de secuenciación de la nueva generación de Illumina. El software MIA FORA se ha diseñado como guía para determinar el tipo HLA a partir de los datos que se hayan generado con el MIA FORA NGS MFlex Library Prep Kit (kit para preparación de bibliotecas). El ensayo se ha concebido para su uso en un laboratorio especializado y experto en la manipulación de ADN para su amplificación y secuenciación. El ensayo se ha concebido para procesarse como panel de 384 hasta 576 muestras. Los resultados se han validado con el software MIA FORA NGS. 5) Y 6) El Kit MIA FORA NGS MFlex 6 se ha concebido para la amplificación y secuenciación de los genes del HLA: HLA-A, HLA-B, “AÑO. HLA-C, HLA-DRB-1, HLA-DQB1, HLA-DPB1 en la plataforma de secuenciación de la nueva generación de Illumina. El software MIA FORA se ha diseñado como guía para determinar el tipo HLA a partir de los datos que se hayan generado con el MIA FORA NGS MFlex 6 Library Prep Kit (kit 6 para preparación de bibliotecas). El ensayo se ha concebido para su uso en un laboratorio especializado y experto en la manipulación de ADN para su amplificación y secuenciación. 7) El Kit MIA FORA NGS MFlex 6 se ha concebido para la amplificación y secuenciación de los genes del HLA: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 y HLA-DPB1 en la plataforma de secuenciación de la nueva generación de Illumina. El software MIA FORA se ha diseñado como guía para determinar el tipo HLA a partir de los datos que se hayan generado con el MIA FORA NGS MFlex Library Prep Kit (kit para preparación de bibliotecas). El ensayo se ha concebido para su uso en un laboratorio especializado y experto en la manipulación de ADN para su amplificación y secuenciación. El ensayo se ha concebido para procesarse como un panel de 384 hasta 576 muestras. Los resultados se han validado con el software MIA FORA NGS.

FORMA DE PRESENTACIÓN: 1) No aplica; 2) Envases por 24 determinaciones conteniendo: A) MIA FORA NGS MFlex 11 PCR kit (kit 11 para PCR), 24 ensayos, con un (1) vial por 450ul. B) MIA FORA NGS Mflex 11 Library Prep kit (kit para preparación de bibliotecas), 24 ensayos con siete (7) viales y una (1) placa adaptadora de índices: L1, mezcla enzimática primaria; L2, mezcla de tampón primaria; L3, enzima ligasa; L4, 2x tampón de ligasa; L5, Mezcla de tampón/ enzima para PCR; L6, Cebadores de amplificación; L7, Agua sin nucleasas; placa adaptadora de índices. 3) Envases por 96 determinaciones conteniendo: A) MIA FORA NGS MFlex 11 PCR kit (kit 11 para PCR), 96 ensayos con un (4) viales por 450ul. B) MIA FORA NGS Mflex 11 Library Prep kit (kit 11 para preparación de bibliotecas), 96 ensayos con ocho viales y una (1) placa adaptadora de índices: L1, mezcla enzimática primaria; L2, mezcla de tampón primaria; L3, enzima ligasa; L4, 2x tampón de ligasa; L5, Mezcla de tampón/ enzima para PCR; L6, Cebadores de amplificación; L7, Agua sin nucleasas; placa adaptadora de índices. 4) Envases por 1152 determinaciones conteniendo: A) MIA FORA NGS MFlex 11 HT PCR kit (kit 11 para PCR) con un vial por 20ml. B) MIA FORA NGS Library Prep kit (kit para preparación de bibliotecas), 1152 ensayos con ocho viales y doce (12) placas adaptadoras de índices: L1, mezcla enzimática primaria; L2, mezcla de tampón primaria; L3, enzima ligasa; L4, 2x tampón de ligasa; L5, Mezcla de tampón/ enzima para PCR; L6, Cebadores de amplificación; L7, Agua sin nucleasas; 12 placas adaptadoras de índices. c) MIA FORA NGS HLA Magnetic Beads (bolas magnéticas) 5) Envases por 24 determinaciones conteniendo: A) MIA FORA NGS MFlex 6 PCR kit

(kit 6 para PCR), 24 ensayos, con un (1) vial por 450ul. B) MIA FORA NGS Mflex 6 Library Prep kit (kit para preparación de bibliotecas), 24 ensayos con siete (7) viales y una (1) placa adaptadora de índices: L1, mezcla enzimática primaria; L2, mezcla de tampón primaria; L3, enzima ligasa; L4, 2x tampón de ligasa; L5, Mezcla de tampón/ enzima para PCR; L6, Cebadores de amplificación; L7, Agua sin nucleasas; placa adaptadora de índices. 6) Envases por 96 determinaciones conteniendo: A) MIA FORA NGS MFlex 6 PCR kit (kit 6 para PCR), 96 ensayos con un (4) viales por 450ul. B) MIA FORA NGS Mflex 6 Library Prep kit (kit 6 para preparación de bibliotecas), 96 ensayos con ocho viales y una (1) placa adaptadora de índices: L1, mezcla enzimática primaria; L2, mezcla de tampón primaria; L3, enzima ligasa; L4, 2x tampón de ligasa; L5, Mezcla de tampón/ enzima para PCR; L6, Cebadores de amplificación; L7, Agua sin nucleasas; placa adaptadora de índices. 7) Envases por 1152 determinaciones conteniendo: A) MIA FORA NGS MFlex 6 HT HLA PCR kit (kit para la PCR del HLA) con un vial por 20ml. B) MIA FORA NGS Library Prep kit (kit para preparación de bibliotecas), 1152 ensayos con ocho viales y doce (12) placas adaptadoras de índices: L1, mezcla enzimática primaria; L2, mezcla de tampón primaria; L3, enzima ligasa; L4, 2x tampón de ligasa; L5, Mezcla de tampón/ enzima para PCR; L6, Cebadores de amplificación; L7, Agua sin nucleasas; 12 placas adaptadoras de índices. c) MIA FORA NGS HLA Magnetic Beads (bolas magnéticas).

**PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN:** 36 meses desde la fecha de elaboración, conservado entre -20 y -80°C.

**NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE:** BioArray Solutions Ltd. 35 Technology Drive, Suite 100 Warren NJ 07059, USA.

**CATEGORÍA:** Uso profesional exclusivo.

N° EX-2021-114575734 -APN-DGA#ANMAT

AM

# RÓTULOS ORIGINALES MIA FORA NGS MFlex HLA Typing Kit

Rótulos externos MIA FORA NGS MFlex , 24 test

**MIA FORA™**

**MFlex 11** **NGS**

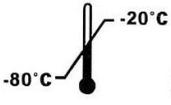
(HLA-A, B, C, DRB1, DRB 3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1)

**CONT**  
(1) MFlex 11-loci PCR Kit  
(8) Library Preparation Reagents

**REF** SR-800-10534-24

**LOT** XX-XXX

YYYY-MM-DD

P/N SR-190-10702 Rev. A

**MIA FORA™**

**MFlex 6** **NGS**

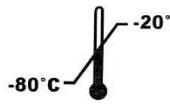
(HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1)

**CONT**  
(1) MFlex 6-loci PCR Kit  
(8) Library Preparation Reagents

**REF** SR-800-10535-24

**LOT** XX-XXX

YYYY-MM-DD

P/N SR-190-10703 Rev. A

  
HEMOMEDICA S.R.L.  
SISTEMI A SPINOSO

  
HEMOMEDICA S.R.L.  
PAULA ZUCCHINI  
Direttore Tecnica  
\*4.N. 12.855

Rótulos externos MIA FORA NGS MFlex , 96 test

**MIA FORA™**

---

**MFlex 11** **NGS**

(HLA-A, B, C, DRB1, DRB 3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1)

<b>CONT</b> (1) MFlex 11-loci PCR Kit (9) Library Preparation Reagents	<b>REF</b> SR-800-10534-96
	<b>LOT</b> XX-XXX
	YYYY-MM-DD

P/N SR-190-10700 Rev. A

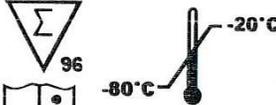
**MIA FORA™**

---

**MFlex 6** **NGS**

(HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1)

<b>CONT</b> (1) MFlex 6-loci PCR Kit (9) Library Preparation Reagents	<b>REF</b> SR-800-10535-96
	<b>LOT</b> XX-XXX
	YYYY-MM-DD

P/N SR-190-10701 Rev. A

  
HEMOMEDICA S.R.L.  
CANTÙ V. S. 10000

  
HEMOMEDICA S.R.L.  
PAULA ZUCCHINI  
Direttore Tecnica  
+39.0323.12.855

Rótulos externos MIA FORA NGS MFlex ,1.152 test

**MIA FORA™**

**HT MFlex 6** **NGS**

(HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1)

**CONT**  
(1) HT MFlex 6-loci PCR Kit  
(20) Library Preparation Reagents

**REF** SR-800-10535-1152

**LOT** XX-XXX

YYYY-MM-DD

Σ 1152

-20°C

-80°C

CE 0197 **IVD**

P/N SR-190-10699 Rev. A

**MIA FORA™**

**HT MFlex 11** **NGS**

(HLA-A, B, C, DRB1, DRB 3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1)

**CONT**  
(1) HT MFlex 11-loci PCR Kit  
(20) Library Preparation Reagents

**REF** SR-800-10534-1152

**LOT** XX-XXX

YYYY-MM-DD

Σ 1152

-20°C

-80°C

CE 0197 **IVD**

P/N SR-190-10698 Rev. A

  
HEMOMEDICA S.R.L.  
CANTIERA 551030  
PAULA PICCHINI

  
HEMOMEDICA S.R.L.  
PAULA PICCHINI  
Direttore Tecnica  
+39.12.855

# Rótulos externos SR-850-00043 MIA FORA NGS FLEX Software



Software MIA FORA NGS Ver.5.X



REF SR-790-00017  
SR-850-00043

Software avanzado para el genotipado NGS del HLA

## Declaración de copyright

Esta documentación y el software MIA FORA NGS son información confidencial y están protegidos por copyright, © 2015, de Sirona Genomics, Inc. Todos los derechos reservados. Nada de esta documentación ni del software puede reproducirse, copiarse, exhibirse, transmitirse, modificarse ni utilizarse sin la previa autorización por escrito de Sirona Genomics, Inc.



HEMOMEDICA S.R.L.  
SISTEMI ALFENINGO  
Via ...



HEMOMEDICA S.R.L.  
PAULA ZUCCHINI  
Direttore Tecnica  
\*I.N. 12.856

## SOBRERÓTULO

**Hemo**Medica

**Importado por:**

HEMOMEDICA S.R.L.

California 2082, Piso 2, Of D217, Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Argentina

**Autorizado por ANMAT PM 1049-66**

Directora Técnica Ana Paula Zucchini.

Farmacéutica M.N. 12.855

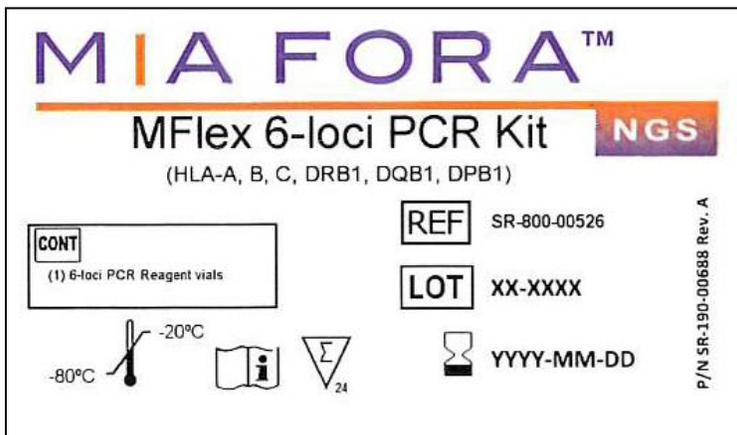
  
HEMOMEDICA S.R.L.  
GUSTAVO ARGENO  
M.N. 12.855

  
HEMOMEDICA S.R.L.  
PAULA ZUCCHINI  
Directora Técnica  
M.N. 12.855

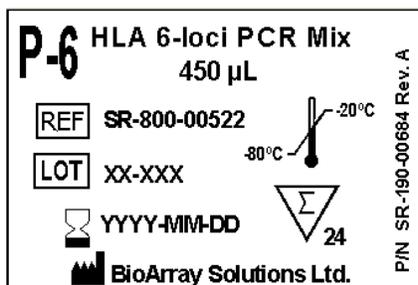
# ROTULOS INTERNOS

## MFLEX 6

- a) MIA FORA NGS **MFlex 6** PCR Kit (kit 6 para PCR), **24** ensayos (**SR-800-00526**):  
con un (1) vial.



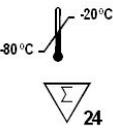
Reactivo para PCR P-6 SR-800-00522 - 1 vial de 450 µl



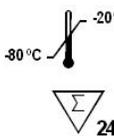
- b) MIA FORA NGS **MFlex 6** Library Prep Kit (kit para preparación de bibliotecas), **24** ensayos (**SR-800-00527**): con siete (7) viales y una (1) placa adaptadora de índices



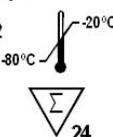
Vial 1: Mezcla enzimática primaria - **SR-800-00426**, 50 µL.

<b>L1</b>	<b>Primary Enzyme Mix</b>	<b>50 µL</b>		<b>P/N SR-190-00485 Rev. B</b>
<b>REF</b>	SR-800-00426			
<b>LOT</b>	XX-XXX			
	YYYY-MM-DD			
	BioArray Solutions Ltd.			

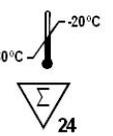
Vial 2: Mezcla de tampón primaria - **SR-800-00427**, 315 µL.

<b>L2</b>	<b>Primary Buffer Mix</b>	<b>315 µL</b>		<b>P/N SR-190-00486 Rev. B</b>
<b>REF</b>	SR-800-00427			
<b>LOT</b>	XX-XXX			
	YYYY-MM-DD			
	BioArray Solutions Ltd.			

Vial 3: Enzima ligasa - **SR-800-00342**, 34 µL.

<b>L3</b>	<b>Ligase Enzyme</b>	<b>34 µL</b>		<b>P/N SR-190-00427 Rev. C</b>
<b>REF</b>	SR-800-00342			
<b>LOT</b>	XX-XXX			
	YYYY-MM-DD			
	BioArray Solutions Ltd.			

Vial 4: 2 viales Tampón de ligasa - **SR-800-00343**, 917 µL

<b>L4</b>	<b>2X Ligase Buffer</b>	<b>917 µL</b>		<b>P/N SR-190-00422 Rev. C</b>
<b>REF</b>	SR-800-00343			
<b>LOT</b>	XX-XXX			
	YYYY-MM-DD			
	BioArray Solutions Ltd.			

  
HEMOMEDICA S.R.L.  
Via ... 10000 ...  
Tel. ...

  
HEMOMEDICA S.R.L.  
PAOLA GUCCINI  
Direttore Tecnica  
Tel. 12.855

Vial 5: Mezcla de tampón/enzima para PCR - **SR-800-00344**, 150 µl

**L5** PCR Enzyme/Buffer Mix  
150 µL

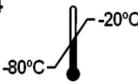
REF SR-800-00344

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00429 Rev. C



Vial 6: Cebadores de amplificación - **SR-800-00345**, 14 µl

**L6** Amplification Primers  
14 µL

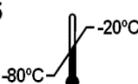
REF SR-800-00345

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00424 Rev. C



Vial 7: Agua sin nucleasas, **SR-800-00362** , 105 µl

**L7** Nuclease-Free Water  
105 µL

REF SR-800-00362

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00432 Rev. C



Placa adaptadora de índices - **SR-800-00349**

**Filled Index Adaptor Plate, 8µL/well**

REF SR-800-00349

LOT 16-XXXA

10059451

YYYY-MM-DD

P/N SR-190-00434 Rev. B



**Filled Index Adaptor Plate, 8µL/well**

REF SR-800-00349

LOT 16-XXXA

10059451

YYYY-MM-DD

P/N SR-190-00434 Rev. B



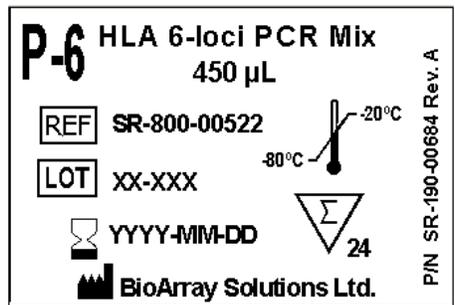
Paula Zucchini  
Farmacéutica  
M.N. 12.855

HEMOMEDICA S.R.L.

a) MIA FORA NGS MFlex 6 PCR Kit (kit 6 para PCR), 96 ensayos (SR-800-00529): con cuatro (4) viales.



Reactivo para PCR P-6 SR-800-00522 - 4 viales de 450 µl



b) MIA FORA NGS MFlex 6 Library Prep Kit (kit 6 para preparación de bibliotecas), 96 ensayos (SR-800-00530): con ocho (8) viales y una (1) placa adaptadora de índices



Vial 1: Mezcla enzimática primaria - **SR-800-00452**, 230 µL.

**L1** Primary Enzyme Mix  
230 µL

REF SR-800-00452 -80°C

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

PIN SR-190-00506 Rev. B

Vial 2: Mezcla de tampón primaria - **SR-800-00453**, 1.330 µL.

**L2** Primary Buffer Mix  
1330 µL

REF SR-800-00453 -80°C

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

PIN SR-190-00507 Rev. B

Vial 3: Enzima ligasa - **SR-800-00454**, 130 µL.

**L3** Ligase Enzyme  
130 µL

REF SR-800-00454 -80°C

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

PIN SR-190-00508 Rev. B

Vial 4: 2 viales Tampón de ligasa - **SR-800-00455**, 1500 µL

**L4** 2X Ligase Buffer  
1500 µL

REF SR-800-00455 -80°C

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

PIN SR-190-00509 Rev. B

Vial 5: Mezcla de tampón/enzima para PCR - **SR-800-00344**, 150 µL

**L5** PCR Enzyme/Buffer Mix  
150 µL

REF SR-800-00344 -80°C

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

PIN SR-190-00429 Rev. C

Paula Lucchini  
Farmacéutica  
M.N. 12.855

HEMOMEDICA S.R.L.

Vial 6: Cebadores de amplificación - **SR-800-00345**, 14 µl

**L6** Amplification Primers  
14 µL

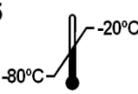
REF SR-800-00345

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00424 Rev. C



Vial 7: Agua sin nucleasas, **SR-800-00362** , 105 µl

**L7** Nuclease-Free Water  
105 µL

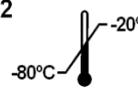
REF SR-800-00362

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00432 Rev. C



Placa adaptadora de índices - **SR-800-00402-01**

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

2 REF SR-800-00402-02

LOT XX-XXX-02

11075547

YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-02 Rev. C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

2 REF SR-800-00402-02

LOT XX-XXX-02

YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-02 Rev. C

11075547



HEMOMEDICA S.R.L.  
SOSTARCA SPIN 280



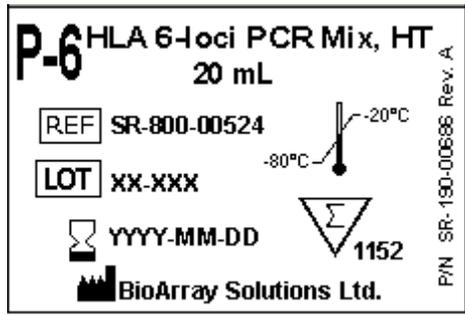
HEMOMEDICA S.R.L.  
PAULA ZUCCHINI  
Direttrice Tecnica  
\*4.N. 12.855



a) MIA FORA NGS **MFlex 6** HT HLA PCR Kit (kit para la PCR del HLA) para **1.152** determinaciones (**SR-800-00532**) con un (1) vial

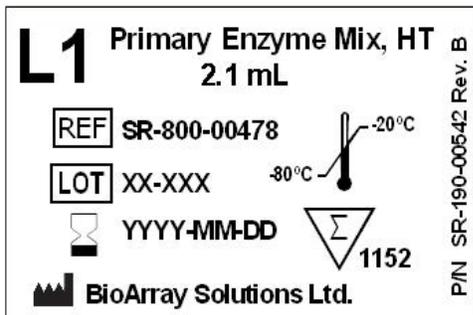


P-6 MFlex 6 HT PCR Reagent (reactivo para la PCR)- **SR-800-00524**, 20 ml



b) MIA FORA NGS Library Prep Kit (kit para preparación de bibliotecas), **1152** ensayos (SR-800-00533): con ocho (**8**) viales y doce (**12**) placas adaptadoras de índices

Mezcla enzimática primaria (**SR-800-00478**) 2.1 ml



HEMOMEDICA S.R.L.  
 Via...  
 41013...  
 Tel. +39 049 8000000

HEMOMEDICA S.R.L.  
 PAULA UCCHINI  
 Direttore Tecnica  
 Tel. +39 049 8000000

Mezcla de Buffer primario (SR-800-00479) 13.3 ml

**L2** Primary Buffer Mix, HT  
13.3 mL

REF SR-800-00479

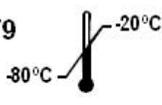
LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

 1152

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00543 Rev. B



Enzima Ligasa (SR-800-00487) 1.4 ml

**L3** Ligase Enzyme, HT  
1.4 mL

REF SR-800-00487

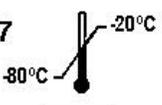
LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

 1152

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00551 Rev. B



Buffer ligasa x 2 viales (SR-800-00488), 17.5 ml

**L4** 2X Ligase Buffer, HT  
17.5 mL

REF SR-800-00488

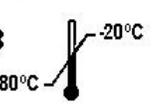
LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

 576

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00552 Rev. B



HEMOMEDICA S.R.L.  
SODALITA' SERVIZIO

HEMOMEDICA S.R.L.  
PAULA ZUCCHINI  
Direttore Tecnica  
\*4.N. 12.855

Mezcla de tampón/enzima paraPCR (SR-800-00492), 415 µl

**L5** PCR Enzyme/Buffer Mix, HT  
415 µL

REF SR-800-00492

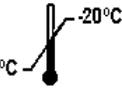
LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

Σ 1152

P/N SR-190-00563 Rev. A



Cebadores de amplificación (SR-800-00490), 35 µl

**L6** Amplification Primer Mix, HT  
35 µL

REF SR-800-00490

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

Σ 1152

P/N SR-190-00564 Rev. A



Agua sin nucleasas (SR-800-00491), 300 µl

**L7** Nuclease-Free Water, HT  
300 µL

REF SR-800-00491

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

Σ 1152

P/N SR-190-00565 Rev. A



Placa adaptadora de índices Dos (2) por kit (SR-800-00402-01; SR-800-00402-02; SR-800-00402-03; SR-800-00402-04; SR-800-00402-05; SR-800-00402-06)

  
HEMOMEDICA S.R.L.  
SUTTA  
12.855

  
HEMOMEDICA S.R.L.  
PAULA ZUCCHINI  
Direttore Tecnica  
+39.011.12.855

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

1 REF SR-800-00402-01  
LOT XX-XXX-01 11075546  
YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-01 Rev. C -80°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

1 REF SR-800-00402-01  
LOT XX-XXX-01 YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-01 Rev. C -80°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

2 REF SR-800-00402-02  
LOT XX-XXX-02 11075547  
YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-02 Rev. C -80°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

2 REF SR-800-00402-02  
LOT XX-XXX-02 YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-02 Rev. C -80°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

3 REF SR-800-00402-03  
LOT XX-XXX-03 11075548  
YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-03 Rev. C -80°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

3 REF SR-800-00402-03  
LOT XX-XXX-03 YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-03 Rev. C -80°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

4 REF SR-800-00402-04  
LOT XX-XXX-04 11075549  
YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-04 Rev. C -80°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

4 REF SR-800-00402-04  
LOT XX-XXX-04 YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-04 Rev. C -80°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

5 REF SR-800-00402-05  
LOT XX-XXX-05 11075550  
YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-05 Rev. C -80°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

5 REF SR-800-00402-05  
LOT XX-XXX-05 YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-05 Rev. C -80°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

6 REF SR-800-00402-06  
LOT XX-XXX-06 11075551  
YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-06 Rev. C -80°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

6 REF SR-800-00402-06  
LOT XX-XXX-06 YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-06 Rev. C -80°C

HEMOMEDICA S.R.L.  
Via ...

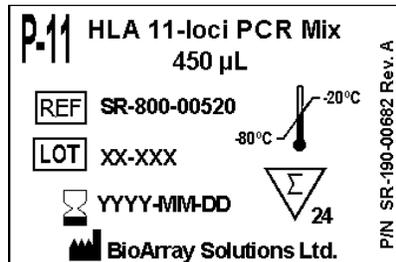
HEMOMEDICA S.R.L.  
Paola Lucchini  
Direttore Tecnica  
+39.02.12.855

# MFLEX 11

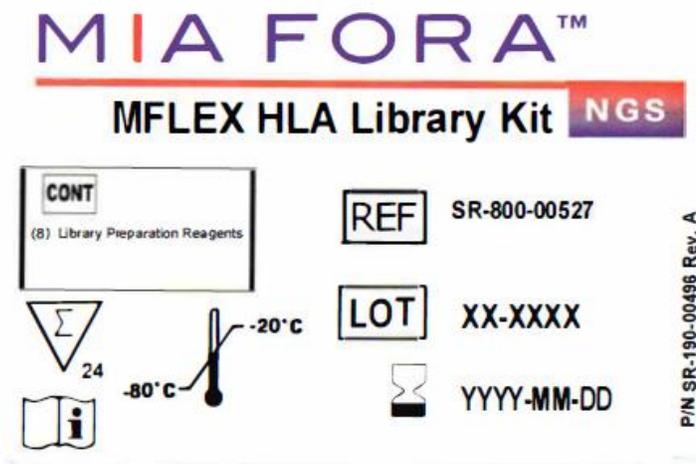
- a) MIA FORA NGS **MFlex 11** PCR Kit (kit 11 para PCR), **24** ensayos (**SR-800-00525**):  
con un (1) vial



Reactivo para PCR P-6 SR-800-00520 - 1 vial de 450 µl



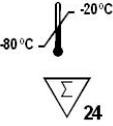
- b) MIA FORA NGS **MFlex 11** Library Prep Kit (kit para preparación de bibliotecas), **24** ensayos (**SR-800-00527**): con siete (7) viales y una (1) placa adaptadora de índices



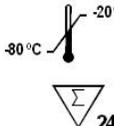
Paula Zucchini  
Farmacéutica  
M.N. 12.855

HEMOMEDICA S.R.L.  
Farmacéutica

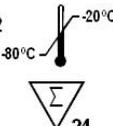
Vial 1: Mezcla enzimática primaria - **SR-800-00426**, 50 µL.

<b>L1</b>	<b>Primary Enzyme Mix</b> 50 µL	 -20°C -80°C	P/N SR-190-00485 Rev. B
REF	SR-800-00426		
LOT	XX-XXX		
	YYYY-MM-DD		
	BioArray Solutions Ltd.		

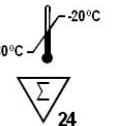
Vial 2: Mezcla de tampón primaria - **SR-800-00427**, 315 µL.

<b>L2</b>	<b>Primary Buffer Mix</b> 315 µL	 -20°C -80°C	P/N SR-190-00486 Rev. B
REF	SR-800-00427		
LOT	XX-XXX		
	YYYY-MM-DD		
	BioArray Solutions Ltd.		

Vial 3: Enzima ligasa - **SR-800-00342**, 34 µL.

<b>L3</b>	<b>Ligase Enzyme</b> 34 µL	 -20°C -80°C	P/N SR-190-00427 Rev. C
REF	SR-800-00342		
LOT	XX-XXX		
	YYYY-MM-DD		
	BioArray Solutions Ltd.		

Vial 4: 2X Tampón de ligasa - **SR-800-00343**, 917 µL

<b>L4</b>	<b>2X Ligase Buffer</b> 917 µL	 -20°C -80°C	P/N SR-190-00422 Rev. C
REF	SR-800-00343		
LOT	XX-XXX		
	YYYY-MM-DD		
	BioArray Solutions Ltd.		

  
HEMOMEDICA S.R.L.  
SOSTAVO A SERVIZIO  
00100 ROMA

  
HEMOMEDICA S.R.L.  
PAULO ZUCCHINI  
Direttore Tecnica  
\*t.n. 12.855

Vial 5: Mezcla de tampón/enzima para PCR - **SR-800-00344**, 150 µl

**L5** PCR Enzyme/Buffer Mix  
150 µL

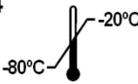
REF SR-800-00344

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00429 Rev. C



Vial 6: Cebadores de amplificación - **SR-800-00345**, 14 µl

**L6** Amplification Primers  
14 µL

REF SR-800-00345

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00424 Rev. C



Vial 7: Agua sin nucleasas, **SR-800-00362** , 105 µl

**L7** Nuclease-Free Water  
105 µL

REF SR-800-00362

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00432 Rev. C



Placa adaptadora de índices - **SR-800-00349**

**Filled Index Adaptor Plate, 8µL/well**

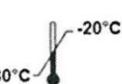
REF SR-800-00349

LOT 16-XXXX

YYYY-MM-DD

P/N SR-190-00434 Rev. B

10059451

**Filled Index Adaptor Plate, 8µL/well**

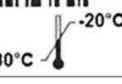
REF SR-800-00349

LOT 16-XXXX

YYYY-MM-DD

P/N SR-190-00434 Rev. B

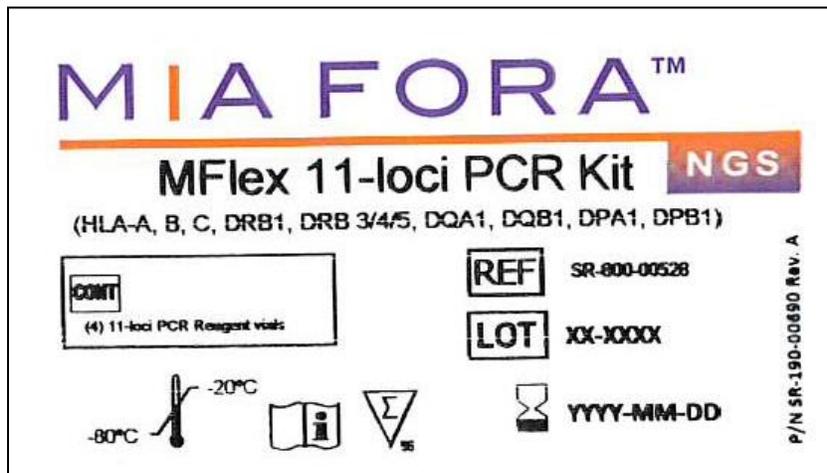
10059451



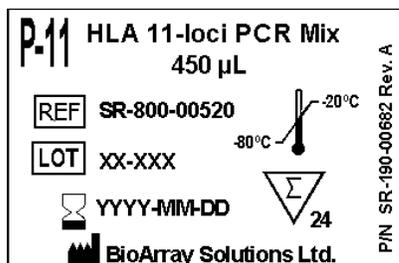
Paula Zucchini  
Farmacéutica  
M.N. 12.855

HEMOMEDICA S.R.L.  
FARMACIA

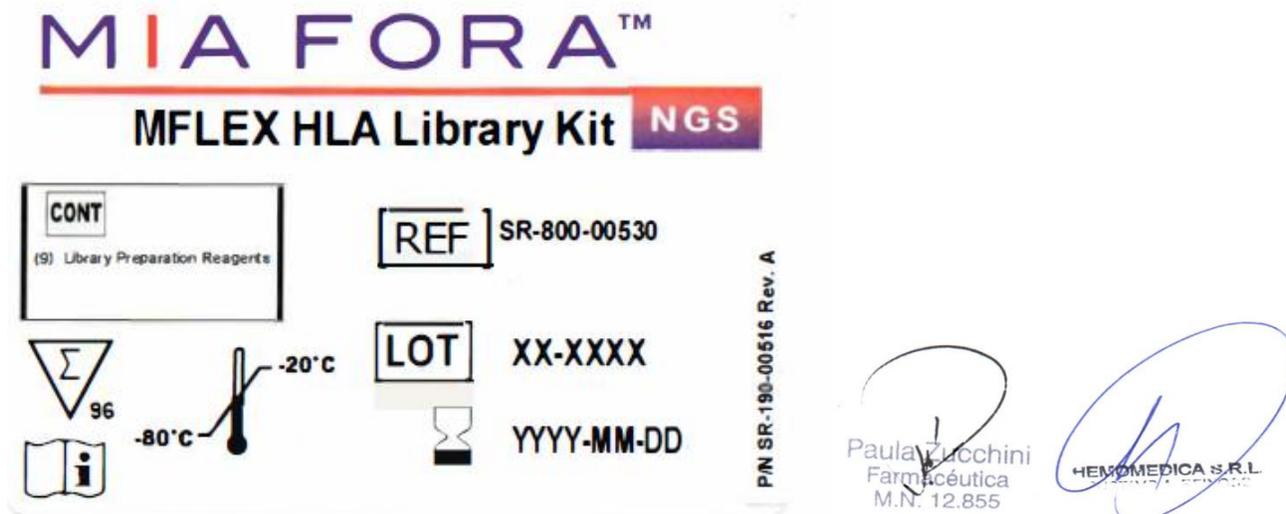
a) MIA FORA NGS **MFlex 11** PCR Kit (kit 11 para PCR), **96** ensayos (SR-800-00528): con cuatro (**4**) viales.



Reactivo para PCR P-6 SR-800-00520 - 4 viales de 450 µl



b) MIA FORA NGS **MFlex 11** Library Prep Kit (kit 11 para preparación de bibliotecas), **96** ensayos (**SR-800-00530**): con ocho (**8**) viales y una (**1**) placa adaptadora de índices



Vial 1: Mezcla enzimática primaria - **SR-800-00452**, 230 µl.

**L1** Primary Enzyme Mix  
230 µL

REF SR-800-00452 -80°C

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

PIN SR-190-00506 Rev. B

Vial 2: Mezcla de tampón primaria - **SR-800-00453**, 1.330 µl.

**L2** Primary Buffer Mix  
1330 µL

REF SR-800-00453 -80°C

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

PIN SR-190-00507 Rev. B

Vial 3: Enzima ligasa - **SR-800-00454**, 130 µl.

**L3** Ligase Enzyme  
130 µL

REF SR-800-00454 -80°C

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

PIN SR-190-00508 Rev. B

Vial 4: 2 viales Tampón de ligasa - **SR-800-00455**, 1500 µl

**L4** 2X Ligase Buffer  
1500 µL

REF SR-800-00455 -80°C

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

PIN SR-190-00509 Rev. B

HEMOMEDICA S.R.L.  
SISTEMA SENSO

HEMOMEDICA S.R.L.  
PAULA ZUCCHINI  
Direttore Tecnica  
+39. 12.855

Vial 5: Mezcla de tampón/enzima para PCR - **SR-800-00344**, 150 µl

**L5** PCR Enzyme/Buffer Mix  
150 µL

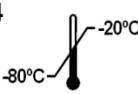
REF SR-800-00344

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00429 Rev. C



Vial 6: Cebadores de amplificación - **SR-800-00345**, 14 µl

**L6** Amplification Primers  
14 µL

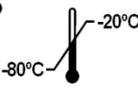
REF SR-800-00345

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00424 Rev. C



Vial 7: Agua sin nucleasas, **SR-800-00362**, 105 µl

**L7** Nuclease-Free Water  
105 µL

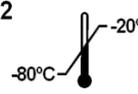
REF SR-800-00362

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00432 Rev. C



Placa adaptadora de índices - **SR-800-00402-01**

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

2 REF SR-800-00402-02

LOT XX-XXX-02

11075547

YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-02 Rev. C



Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

2 REF SR-800-00402-02

LOT XX-XXX-02

11075547

YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-02 Rev. C



HEMOMEDICA S.R.L.  
SUSTAVIA SPINOSCO

HEMOMEDICA S.R.L.  
PAOLA ZUCCHINI  
Direttore Tecnica  
+39.030.12.855

a) MIA FORA NGS MFlex 11 HT PCR Kit (kit para la PCR) (SR-800-00531) 1152 ensayos con un (1) vial

**MIA FORA™**

**HT MFlex 11-loci PCR Kit NGS**

(HLA-A, B, C, DRB1, DRB 3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1)

**CONT**  
(1) 11-loci PCR Reagent vial

**REF** SR-800-00531

**LOT** XX-XXXX

Yyyy-MM-DD

-80°C -20°C

Σ 1152

P/N SR-190-00693 Rev. A

P-6 MFlex 6 HT PCR Reagent (reactivo para la PCR)- SR-800-00521, 20 ml

**P-11 HLA 11-loci PCR Mix, HT**  
20 mL

**REF** SR-800-00521

**LOT** XX-XXX

Yyyy-MM-DD

-80°C -20°C

Σ 1152

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00683 Rev. A

b) MIA FORA NGS Library Prep Kit (kit para preparación de bibliotecas), 1152 ensayos con ocho (8) viales y doce (12) placas adaptadoras de índices.

Mezcla enzimática primaria (SR-800-00478) 2.1 ml

**L1 Primary Enzyme Mix, HT**  
2.1 mL

**REF** SR-800-00478

**LOT** XX-XXX

Yyyy-MM-DD

-80°C -20°C

Σ 1152

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00542 Rev. B

Paula Zucchini  
Farmacéutica  
M.N. 12.855

HEMOMEDICA S.R.L.

Mezcla de Buffer primario (SR-800-00479) 13.3 ml

**L2** Primary Buffer Mix, HT  
13.3 mL

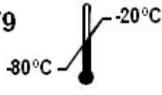
REF SR-800-00479

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00543 Rev. B



Enzima Ligasa (SR-800-00487) 1.4 ml

**L3** Ligase Enzyme, HT  
1.4 mL

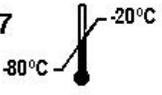
REF SR-800-00487

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00551 Rev. B



Buffer ligasa x 2 viales (SR-800-00488), 17.5 ml

**L4** 2X Ligase Buffer, HT  
17.5 mL

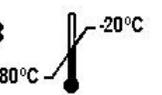
REF SR-800-00488

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

P/N SR-190-00552 Rev. B



HEMOMEDICA S.R.L.  
SUSANNA SPINZIO  
12.855

HEMOMEDICA S.R.L.  
PAOLA ZUCCHINI  
Direttore Tecnica  
\*A.N. 12.855

Mezcla de tampón/enzima paraPCR (SR-800-00492), 415 µl

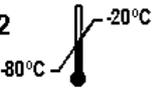
**L5** PCR Enzyme/Buffer Mix, HT  
415 µL

REF SR-800-00492

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

 BioArray Solutions Ltd.



 1152

P/N SR-190-00653 Rev. A

Cebadores de amplificación (SR-800-00490), 35 µl

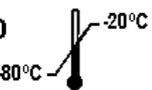
**L6** Amplification Primer Mix, HT  
35 µL

REF SR-800-00490

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

 BioArray Solutions Ltd.



 1152

P/N SR-190-00654 Rev. A

Agua sin nucleasas (SR-800-00491) , 300 µl

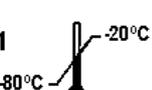
**L7** Nuclease-Free Water, HT  
300 µL

REF SR-800-00491

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

 BioArray Solutions Ltd.



 1152

P/N SR-190-00655 Rev. A

Placa adaptadora de índices Dos (2) por kit (SR-800-00402-01; SR-800-00402-02; SR-800-00402-03; SR-800-00402-04; SR-800-00402-05; SR-800-00402-06)

  
HEMOMEDICA S.R.L.  
PALLA ZUCCHINI  
Direttore Tecnica  
\*1.N. 12.855

  
HEMOMEDICA S.R.L.  
PALLA ZUCCHINI  
Direttore Tecnica  
\*1.N. 12.855

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

1 REF SR-800-00402-01  
LOT XX-XXX-01 11075546  
YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-01 Rev. C -80°C -20°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

1 REF SR-800-00402-01  
LOT XX-XXX-01 YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-01 Rev. C -80°C -20°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

2 REF SR-800-00402-02  
LOT XX-XXX-02 11075547  
YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-02 Rev. C -80°C -20°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

2 REF SR-800-00402-02  
LOT XX-XXX-02 YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-02 Rev. C -80°C -20°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

3 REF SR-800-00402-03  
LOT XX-XXX-03 11075548  
YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-03 Rev. C -80°C -20°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

3 REF SR-800-00402-03  
LOT XX-XXX-03 YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-03 Rev. C -80°C -20°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

4 REF SR-800-00402-04  
LOT XX-XXX-04 11075549  
YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-04 Rev. C -80°C -20°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

4 REF SR-800-00402-04  
LOT XX-XXX-04 YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-04 Rev. C -80°C -20°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

5 REF SR-800-00402-05  
LOT XX-XXX-05 11075550  
YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-05 Rev. C -80°C -20°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

5 REF SR-800-00402-05  
LOT XX-XXX-05 YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-05 Rev. C -80°C -20°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

6 REF SR-800-00402-06  
LOT XX-XXX-06 11075551  
YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-06 Rev. C -80°C -20°C

Filled Index Adaptor Plate, 10µL/well

6 REF SR-800-00402-06  
LOT XX-XXX-06 YYYY-MM-DD P/N SR-190-00469-06 Rev. C -80°C -20°C

HEMOMEDICA S.R.L.  
PALLA ZUCCHINI  
Direttore Tecnica  
+39.0432.85555

HEMOMEDICA S.R.L.  
PALLA ZUCCHINI  
Direttore Tecnica  
+39.0432.85555

Documentación del producto y traducciones disponibles en: [www.immucor.com](http://www.immucor.com)

## P R O S P E C T O

MIA FORA™ NGS MFIlex HLA Typing Kit (kit de tipificación del HLA)  
 Para uso diagnóstico in vitro

### CONTENIDOS

Definición de símbolos .....	1	Extracción y preparación de muestras .....	8
Reactivos por número de catálogo.....	2	Procedimiento.....	9
Uso previsto.....	6	A. Materiales suministrados .....	9
Resumen y explicación .....	6	B. Materiales necesarios pero no suministrados.....	9
Principios del procedimiento .....	6	Instrucciones de uso.....	9
Reactivos.....	7	Control de calidad.....	19
A. Identificación.....	7	Limitación del procedimiento .....	19
B. Advertencias y precauciones.....	7	Características específicas de rendimiento.....	19
C. Instrucciones de almacenamiento .....	8	Solución de problemas .....	21
D. Purificación o tratamiento para su uso ....	8	Limitación de la licencia.....	22
E. Indicaciones de inestabilidad.....	8	Información del fabricante .....	22
Requisitos del instrumento .....	8	Marcas comerciales utilizadas.....	22

### Definición de símbolos

Código de lote		Número de catálogo		Límite de temperatura	
Fecha de caducidad		Número de serie		Contenido suficiente para <n> ensayos	
Precaución		Consultar instrucciones de uso		Fabricante	
Representante autorizado de la Comunidad Europea		Producto sanitario para diagnóstico in vitro		Contiene	
		Conformité Européene			

## REACTIVOS POR NÚMERO DE CATÁLOGO

MIA FORA NGS MFlex HLA Typing Kit (kit de tipificación del HLA) con kits de reactivos para 6 u 11 genes.

**Kit MIA FORA NGS MFlex 6, 24 ensayos, para su uso con la plataforma de secuenciación de nueva generación de Illumina. N.º de catálogo SR-800-10535-24.**

- a) MIA FORA NGS MFlex 6 PCR Kit (kit 6 para PCR), 24 ensayos (SR-800-00526):  
con un (1) vial

	Número del producto	Volumen de llenado	Almacenamiento	
Reactivo para PCR P-6	SR-800-00522	450 µl	De -20 a -80 °C (Almacenamiento a largo plazo: -20 °C en congelador de descongelación manual)	

- b) MIA FORA NGS MFlex 6 Library Prep Kit (kit para preparación de bibliotecas), 24 ensayos (SR-800-00527):  
con siete (7) viales y una (1) placa adaptadora de índices

Reactivo		Número del producto	Volumen de llenado	Almacenamiento	
L1	Mezcla enzimática primaria	SR-800-00426	50 µl	De -20 a -80 °C (Almacenamiento a largo plazo: -20 °C en congelador de descongelación manual)	
L2	Mezcla de tampón primaria	SR-800-00427	315 µl		
L3	Enzima ligasa	SR-800-00342	34 µl		
L4	2X Tampón de ligasa	SR-800-00343	917 µl		
L5	Mezcla de tampón/enzima para PCR	SR-800-00344	150 µl		
L6	Cebadores de amplificación	SR-800-00345	14 µl		
L7	Agua sin nucleasas	SR-800-00362	105 µl		
Placa adaptadora de índices		SR-800-00349	8 µl/pocillo		
Tres columnas llenas de una (1) placa de 96 pocillos O BIEN Todas las columnas llenas de una (1) placa de 96 pocillos		O BIEN Uno (1) de los siguientes: SR-800-00402-01 SR-800-00402-02 SR-800-00402-03 SR-800-00402-04 SR-800-00402-05 SR-800-00402-06	10 µl/pocillo		

**Kit MIA FORA NGS MFlex 11, 24 ensayos, para su uso con la plataforma de secuenciación de nueva generación de Illumina. N.º de catálogo SR-800-10534-24.**

- a) MIA FORA NGS MFlex 11 PCR Kit (kit 11 para PCR), 24 ensayos (SR-800-00525):  
con un (1) vial

	Número del producto	Volumen de llenado	Almacenamiento	
Reactivo para PCR P-11	SR-800-00520	450 µl	De -20 a -80 °C (Almacenamiento a largo plazo: -20 °C en congelador de descongelación manual)	

- b) MIA FORA NGS MFlex 11 Library Prep Kit (kit para preparación de bibliotecas), 24 ensayos (SR-800-00527):  
con siete (7) viales y una (1) placa adaptadora de índices

	Reactivo	Número del producto	Volumen de llenado	Almacenamiento	
L1	Mezcla enzimática primaria	SR-800-00426	50 µl	De -20 a -80 °C (Almacenamiento a largo plazo: -20 °C en congelador de descongelación manual)	
L2	Mezcla de tampón primaria	SR-800-00427	315 µl		
L3	Enzima ligasa	SR-800-00342	34 µl		
L4	2X Tampón de ligasa	SR-800-00343	917 µl		
L5	Mezcla de tampón/enzima para PCR	SR-800-00344	150 µl		
L6	Cebadores de amplificación	SR-800-00345	14 µl		
L7	Agua sin nucleasas	SR-800-00362	105 µl		
	Placa adaptadora de índices	SR-800-00349	8 µl/pocillo		
	Tres columnas llenas de una (1) placa de 96 pocillos O BIEN Todas las columnas llenas de una (1) placa de 96 pocillos	O BIEN Uno (1) de los siguientes: SR-800-00402-01 SR-800-00402-02 SR-800-00402-03 SR-800-00402-04 SR-800-00402-05 SR-800-00402-06	10 µl/pocillo		

**Kit MIA FORA NGS MFlex 6, 96 ensayos, para su uso con la plataforma de secuenciación de nueva generación de Illumina. N.º de catálogo SR-800-10535-96.**

- a) MIA FORA NGS MFlex 6 PCR Kit (kit 6 para PCR), 96 ensayos (SR-800-00529): con cuatro (4) viales

	Número del producto	Volumen de llenado	Almacenamiento	
Reactivo para PCR P-6	SR-800-00522	450 µl (x4)	De -20 a -80 °C (Almacenamiento a largo plazo: -20 °C en congelador de descongelación manual)	

- b) MIA FORA NGS MFlex 6 Library Prep Kit (kit 6 para preparación de bibliotecas), 96 ensayos (SR-800-00530): con ocho (8) viales y una (1) placa adaptadora de índices

Reactivo		Número del producto	Volumen de llenado	Almacenamiento	
L1	Mezcla enzimática primaria	SR-800-00452	230 µl	De -20 a -80 °C (Almacenamiento a largo plazo: -20 °C en congelador de descongelación manual)	
L2	Mezcla de tampón primaria	SR-800-00453	1,33 ml		
L3	Enzima ligasa	SR-800-00454	130 µl		
L4	2X Tampón de ligasa	SR-800-00455	1,5 ml (x2)		
L5	Mezcla de tampón/enzima para PCR	SR-800-00344	150 µl		
L6	Cebadores de amplificación	SR-800-00345	14 µl		
L7	Agua sin nucleasas	SR-800-00362	105 µl		
Placa adaptadora de índices Todas las columnas llenas de una (1) placa de 96 pocillos		Uno (1) de los siguientes: SR-800-00402-01 SR-800-00402-02 SR-800-00402-03 SR-800-00402-04 SR-800-00402-05 SR-800-00402-06	10 µl/pocillo		

**Kit MIA FORA NGS MFlex 11, 96 ensayos, para su uso con la plataforma de secuenciación de nueva generación de Illumina. N.º de catálogo SR-800-10534-96.**

- a) MIA FORA NGS MFlex 11 PCR Kit (kit 11 para PCR), 96 ensayos (SR-800-00528):  
con cuatro (4) viales

	Número del producto	Volumen de llenado	Almacenamiento	
Reactivo para PCR P-11	SR-800-00520	450 µl (x4)	De -20 a -80 °C (Almacenamiento a largo plazo: -20 °C en congelador de descongelación manual)	

- b) MIA FORA NGS MFlex 11 Library Prep Kit (kit 11 para preparación de bibliotecas), 96 ensayos (SR-800-00530):  
con ocho (8) viales y una (1) placa adaptadora de índices

Reactivo		Número del producto	Volumen de llenado	Almacenamiento	
L1	Mezcla enzimática primaria	SR-800-00452	230 µl	De -20 a -80 °C (Almacenamiento a largo plazo: -20 °C en congelador de descongelación manual)	
L2	Mezcla de tampón primaria	SR-800-00453	1,33 ml		
L3	Enzima ligasa	SR-800-00454	130 µl		
L4	2X Tampón de ligasa	SR-800-00455	1,5 ml (x2)		
L5	Mezcla de tampón/enzima para PCR	SR-800-00344	150 µl		
L6	Cebadores de amplificación	SR-800-00345	14 µl		
L7	Agua sin nucleasas	SR-800-00362	105 µl		
Placa adaptadora de índices  Todas las columnas llenas de una (1) placa de 96 pocillos		Uno (1) de los siguientes: SR-800-00402-01 SR-800-00402-02 SR-800-00402-03 SR-800-00402-04 SR-800-00402-05 SR-800-00402-06	10 µl/pocillo		

## USO PREVISTO

MFlex 6	El kit MIA FORA™ NGS MFlex 6 se ha concebido para la amplificación y secuenciación de los genes del HLA HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 y HLA-DPB1 en la plataforma de secuenciación de nueva generación de Illumina. El software MIA FORA se ha diseñado como guía para determinar el tipo de HLA a partir de los datos que se hayan generado con el MIA FORA NGS MFlex 6 Library Prep Kit (kit 6 para preparación de bibliotecas). El ensayo se ha concebido para su uso en un laboratorio especializado y experto en la manipulación de ADN para su amplificación y secuenciación.
MFlex 11	El kit MIA FORA™ NGS MFlex 11 se ha concebido para la amplificación y secuenciación de los genes del HLA HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB-1/3/4/5, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DPA1 y HLA-DPB1 en la plataforma de secuenciación de nueva generación de Illumina. El software MIA FORA se ha diseñado como guía para determinar el tipo de HLA a partir de los datos que se hayan generado con el MIA FORA NGS MFlex 11 Library Prep Kit (kit 11 para preparación de bibliotecas). El ensayo se ha concebido para su uso en un laboratorio especializado y experto en la manipulación de ADN para su amplificación y secuenciación.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La tipificación basada en la secuencia (SBT) de exones amplificados mediante PCR de los genes del HLA es un procedimiento de laboratorio frecuente. La amplificación mediante PCR se utiliza para enriquecer las secuencias diana y posteriormente tipificar el HLA de las regiones seleccionadas. Otros métodos como las sondas de oligonucleótidos específicas de secuencia (SSOP) y los ensayos de extensión de cebadores específicos de secuencia (SSP) también se han utilizado para determinar la tipificación del HLA. El sistema de tipificación MIA FORA NGS MFlex es una metodología de tipificación del HLA nueva que emplea la capacidad para capturar todas las regiones pertinentes de los locus del HLA mediante PCR de gran alcance. En el kit se incluye una mezcla maestra para PCR que contiene todos los componentes necesarios para amplificar cada gen, incluidas enzimas, tampones, dNTP y cebadores para la amplificación mediante PCR de gran alcance. A continuación, el ADN amplificado puede procesarse con el MIA FORA NGS MFlex Library Prep Kit (kit para preparación de bibliotecas) con el objeto de generar una biblioteca para secuenciarla en la plataforma de Illumina. El kit permite la secuenciación mediante multiplexación de hasta 96 muestras con la plataforma de Illumina.

## PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El kit MIA FORA NGS MFlex se ha diseñado para tipificar los locus del HLA de clase I y clase II mediante la secuenciación del gen completo o de los exones e intrones con mayor información. El kit MIA FORA NGS MFlex utiliza la PCR de gran alcance para capturar y enriquecer los genes de clase I HLA-A, HLA-B y HLA-C, y los genes de clase II HLA-DQB1, HLA-DPB1, HLA-DPA1, HLA-DQA1 y HLA-DRB1/3/4/5, que se amplifica como dos segmentos solapados debido a su gran tamaño. En el sistema MIA FORA, se hace referencia a ellos como DRB-S y DRB-L. El MIA FORA NGS MFlex Library Prep Kit (kit para preparación de bibliotecas) genera una biblioteca a partir del ADN amplificado para su secuenciación en la plataforma de Illumina. El software MIA FORA proporciona la secuencia de los genes relevantes de HLA así como información de la ordenación para lograr una tipificación del HLA de alta resolución.

## REACTIVOS

### A. Identificación

Consulte las tablas de la sección Reactivos por número de catálogo para obtener un listado completo de productos y números de catálogos.

### B. Advertencias y precauciones

1. Solo para uso diagnóstico *in vitro* dentro de la Unión Europea.
2. Los resultados de estos kits no deben emplearse como única base sobre la cual tomar una decisión clínica que afecte al paciente.
3. Los kits deben utilizarse en un periodo de cuatro (4) meses desde su uso inicial y pueden someterse a un máximo de cuatro (4) ciclos de congelación/descongelación. Los kits deben almacenarse congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
4. Deben asignarse laboratorios separados o espacios cerrados en el laboratorio para las manipulaciones previas a la PCR, así como para las manipulaciones posteriores a la PCR.
5. Deben emplearse pipetas separadas para las manipulaciones previas a la PCR, así como para las manipulaciones posteriores a la PCR.
6. **Riesgo biológico:** Todas las muestras biológicas y sanguíneas deben tratarse como muestras potencialmente infecciosas. **Siga las directrices de precaución universales cuando las manipule.**
7. Nunca pipetee con la boca. Evite el contacto de reactivos o muestras con la piel y membranas mucosas.
8. Deseche los materiales usados de acuerdo con las normativas del centro o locales para la eliminación de materiales potencialmente biopeligrosos.
9. La tecnología de PCR es sensible a la contaminación, especialmente de su propio producto. Los aerosoles de amplicones de PCR que se generan durante los pasos post-PCR son una fuente frecuente de contaminación. Se debe tener cuidado de evitar las salpicaduras excesivas y la generación de aerosoles. Durante el uso del equipo, deben seguirse también las medidas habituales de laboratorio para PCR, como limpiar las superficies de trabajo antes del procesamiento o la preparación de las muestras para PCR con lejía al 10 % recién preparada, el uso de luz ultravioleta (UV) en campanas o armarios de seguridad biológica entre los usos, la separación en espacio y tiempo de las actividades previas y posteriores a la PCR, el uso de reactivos de PCR en alícuotas y el uso de controles positivos y negativos, entre otros. El empleo de una técnica coherente y cautelosa garantizará una mínima contaminación de la PCR.
10. Los laboratorios deben validar sus propios procedimientos de limpieza.
11. La contaminación de los reactivos o las muestras puede provocar resultados erróneos. Por lo tanto, tenga cuidado de evitar la contaminación de este producto durante su uso. No utilice reactivos contaminados.
12. Utilice los líquidos del kit como se suministren. Su dilución o alteración puede generar resultados erróneos. No mezcle reactivos de diferentes lotes.
13. No use frascos con fugas o no rotulados.
14. Las muestras o reactivos previamente congelados deben mezclarse bien y centrifugarse posteriormente después de descongelarlos y antes de los ensayos. Evite la generación de espuma y burbujas en las muestras.
15. Mantenga todas las enzimas y las mezclas maestras en hielo o criobloques (de  $2$  a  $8^{\circ}\text{C}$ ) durante la descongelación.
16. Compruebe el correcto sellado de los tubos de muestras antes de la amplificación para impedir la evaporación.
17. A causa de las diferencias inherentes en los mecanismos del funcionamiento del termociclador, puede producirse una variación en los resultados al transferir perfiles térmicos establecidos entre diferentes marcas y modelos de instrumentos termocicladores. En algunos casos, la especificidad y la sensibilidad de la reacción pueden verse afectadas, lo que puede provocar una falsa interpretación y comunicación de los datos. El usuario debe validar otros termocicladores y perfiles.
18. Unos tiempos de incubación o unas temperaturas distintas a las especificadas pueden dar resultados erróneos.
19. El incumplimiento de las directrices de uso recomendadas puede provocar un rendimiento no óptimo del producto. En función de la naturaleza y gravedad del incumplimiento, pueden producirse un fallo del análisis (muestra individual o fallos de la ejecución) o unos resultados erróneos. Por ejemplo, hemos determinado que la utilización de bolas para limpieza insuficientes/inactivas en el ensayo puede provocar una elevada incidencia de fallos en el adaptador de índices que haga que no haya datos suficientes para la tipificación.
20. Se recomienda que realice una electroforesis en gel para el análisis de los productos de amplificación de genes del HLA por tamaño. Los productos de PCR deben visualizarse con bromuro de etidio o GelRed; otras tinciones pueden mostrar bandas débiles.
21. En algunos pasos del protocolo se utilizan bolas magnéticas. Es importante que retire el etanol antes de proceder al paso de elución sin haber dejado que las bolas se sequen en exceso. La superficie de las bolas magnéticas debe mostrar un aspecto vidrioso sin colecciones visibles de líquido. El tiempo de secado adecuado puede determinarse de manera empírica en cada laboratorio (de 5 a 10 minutos).
22. Utilice etanol recién diluido al 80 % para cada limpieza con bolas.
23. La placa de preparación primaria limpiada con bolas debe pasar directamente al paso de ligación al adaptador.
24. Cuando prepare la placa de ligación al adaptador de índices, utilice unos guantes nuevos para manipular la placa adaptadora. Retire con cuidado el adhesivo de la placa. Compruebe que todos los pocillos de las columnas 1, 2 y 3 de SR-800-00349 contengan alrededor de  $8\ \mu\text{l}$  de solución y que todos los pocillos de SR-800-00402 contengan alrededor de  $10\ \mu\text{l}$  de solución.
25. La biblioteca amplificada debe purificarse transcurrida una hora de la amplificación.

26. A continuación, se enumeran los puntos de detención seguros durante los cuales las muestras y la biblioteca se pueden almacenar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de hasta 4 días: tras la PCR de gran alcance, tras la limpieza con bolas para la consolidación y tras la limpieza con bolas para la amplificación.
27. Los pasos posteriores a la amplificación de bibliotecas deben realizarse en una sala de secuenciación o en una campana para PCR AirClean para evitar la contaminación de ADN ligado al adaptador de índices con productos finales que contienen las secuencias de grupos de Illumina.
28. La configuración de la cuantificación de bibliotecas con Qubit debe llevarse a cabo con un tampón de dilución fresco para evitar cualquier contaminación.
29. Lleve a cabo la desnaturalización de la muestra con hidróxido sódico fresco según las instrucciones del fabricante para la plataforma de secuenciación.
30. Realice todos los lavados de mantenimiento y posteriores al procedimiento del secuenciador, así como sus limpiezas habituales, según las instrucciones del fabricante para cada plataforma de secuenciación de Illumina.
31. No es posible combinar los adaptadores de índices de los kits MIA FORA NGS MFlex de 24 y 96 ensayos en una secuenciación.

### C. Instrucciones de almacenamiento

1. Almacene el kit MIA FORA NGS MFlex a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un congelador de descongelación manual.
2. No utilice los componentes una vez vencidas sus fechas de caducidad.
3. Almacene las bolas magnéticas a una temperatura entre  $2\text{ y }8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### D. Purificación o tratamiento requerido para su uso

Consulte "Extracción y preparación de muestras".

### E. Indicaciones de inestabilidad

1. Si se han precipitado sales fuera de la solución durante el transporte o almacenamiento, vuelva a solubilizar por completo antes de su uso mediante agitación vorticial a temperatura ambiente (de  $18\text{ a }30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

## REQUISITOS DEL INSTRUMENTO

1. Termociclador equipado con tapa calefactada, tiempos de aumento ajustables y un rango térmico mínimo de  $2\text{ a }100\text{ }^{\circ}\text{C}$  con una precisión de al menos  $\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Puede que deban modificarse las condiciones de los termocicladores para optimizar los perfiles. Se ha validado el termociclador Veriti de Applied Biosystems, si se ejecuta en el modo predeterminado con una velocidad de aumento de  $3,9\text{ }^{\circ}\text{C/s}$ .<sup>1</sup>
2. Método/aparato apropiado para el aislamiento y la purificación de fragmentos de ADN con un tamaño de aproximadamente 500 a 900 pares de bases. Se ha validado un aparato para la selección de ese tamaño: instrumento Pippin Prep™. También se ha validado un método alternativo para la selección del tamaño utilizando bolas magnéticas.
3. Sistema de manipulación de líquidos opcional para generación semiautomatizada de bibliotecas. Se han validado los sistemas Biomek 4000 e i5.<sup>1</sup>
4. Se ha validado el sistema Qubit como aparato/método adecuado para la cuantificación de bibliotecas.<sup>1</sup>
5. Se ha validado la plataforma de secuenciación de Illumina.<sup>1</sup>
6. Software y servidor MIA FORA NGS: Número de referencia de Immucor SR-790-00017, SR-850-00043, SR-790-00020 y SR-850-00062.

<sup>1</sup> Estas metodologías se validaron en Immucor; el usuario deberá revisar sus requisitos específicos y realizar sus propias validaciones.

## EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- El ADN genómico humano puede purificarse a partir de sangre completa, capas plaquetarias e hisopos bucales a través de un método validado que cumpla los criterios que figuran a continuación. El ADN extraído de sangre conservada en EDTA se ha analizado y ha demostrado que ofrece el nivel de rendimiento esperado en este ensayo. El ADN extraído de sangre conservada en heparina no se puede utilizar en este ensayo.
- El ADN aislado debe conservarse en Tris-HCl de  $10\text{ mM}$ , con un pH de  $8,0\text{ a }9,0$ , o bien en agua sin nucleasas. Si se emplea un agente quelante como el EDTA, la concentración final del agente quelante no debe superar los  $0,5\text{ mM}$ .
- La concentración final de ADN debe ser de  $5\text{ a }15\text{ ng/}\mu\text{l}$  para extracciones de sangre completa y capas plaquetarias.
- La concentración final de ADN debe ser de  $2,5\text{ a }7,5\text{ ng/}\mu\text{l}$  para extracciones de hisopos bucales.
- Las mediciones de absorbancia de la muestra de ADN a  $260\text{ y }280\text{ nm}$  deben ofrecer un cociente de  $1,65\text{ a }2,0$ .
- El ADN se puede utilizar inmediatamente después del aislamiento o almacenar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de hasta 1 año. Deben evitarse los ciclos repetidos de congelación/descongelación dado que puede degradar el ADN.
- Al menos el  $50\%$  de la muestra de ADN genómico debe estar compuesto de fragmentos superiores a  $10\text{ kb}$  para llevar a cabo una amplificación mediante PCR de gran alcance correcta.

## PROCEDIMIENTO

### A. **Materiales suministrados** (Consulte la tabla en la sección Reactivos por número de catálogo para obtener información más específica).

- Reactivo para PCR
- Reactivos para la preparación de bibliotecas y la placa adaptadora de índices
- MIA FORA HLA Magnetic Bead Kit (kit de bolas magnéticas) (n.º de cat. SR-800-10379-01)
- Software MIA FORA NGS (Nota: Proporcionado durante la instalación inicial del laboratorio)

### B. **Materiales, reactivos y equipos necesarios, pero no suministrados**

- Termocicladores: se han validado los termocicladores ABI Veriti® y 9700
- Gradillas magnéticas para eluciones de bajo volumen en placas de 96 pocillos: se ha validado Alpaqua Magnum FLX
- Gradilla magnética para separación magnética de tubos de microcentrífuga: se ha validado el imán DynaMag-2
- Microcentrífuga de tubos y centrífuga de placas de sobremesa
- Pipetas, pipetas multicanal y puntas (1-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)
- Adhesivos para sellado de placas de PCR: se ha validado el film adhesivo para PCR Accuseal (Thomas Scientific, n.º de cat. T796150; 4titude, n.º de cat. 4ti-0500)
- Tubos en tiras de PCR y tubos para centrífuga de 1,5 ml
- Mezcladora vorticial
- Placas de 96 pocillos con semifaldilla y cubierta dura FrameStar® (Thomas Scientific, n.º de cat. EK-75012; 4titude, n.º de cat. 4ti-0770/C)
- Reservorios para reactivos
- Almohadillas de cinta de sellado transparentes
- Papel para lentes
- Puntas de pipetas desechables con filtro (resistentes a aerosoles) que cubren la gama de 0,1 µl a 1000 µl
- Etanol 200 probado para biología molecular
- Tris-HCl de 10 mM y pH 8,0
- Tween 20 al 100 %
- Hidróxido de sodio, 1 N
- Agua sin nucleasas
- Agarosa al 1,5 %, libre de tinciones, patrones internos, Pippin Prep™, de 250 pb a 1,5 kb (Sage Science, CDF1510)
- Control PhiX, v. 3 (Illumina n.º de cat. FC-110-3001)
- Al menos uno de los siguientes kits:
  - MiSeq® v. 2 Kit, 300 ciclos (Illumina, n.º de cat. MS102-2002)
  - MiSeq® Reagent Micro v. 2 Kit, 300 ciclos (Illumina, n.º de cat. MS-103-1002)
  - MiniSeq Mid Output Reagent Kit, 300 ciclos (Illumina, n.º de cat. FC-420-1004)
  - MiniSeq High Output Kit, 300 ciclos (Illumina, n.º de cat. FC-420-1003)
  - iSeq 100 i1 Reagent, 300 ciclos, kit de reactivos de un solo uso (Illumina, n.º de cat. 20021533) o paquete de cuatro (Illumina, n.º de cat. 20021534)
- Aparato/kit/método de cuantificación de bibliotecas preciso: se ha validado el fluorómetro Qubit

## INSTRUCCIONES DE USO

El ensayo puede llevarse a cabo para hasta 96 muestras siguiendo el protocolo manual que se describe a continuación. También hay disponible un protocolo de automatización detallado para los kits MIFlex con los instrumentos Biomek 4000 y Biomek i5 a través del representante de ventas técnico de Immucor. Los usuarios deberán llevar a cabo sus propias validaciones si utilizan otros sistemas de manipulación de líquido automatizados.

### NOTAS:

- Extremar las precauciones en el proceso de pipeteado. Utilice pipetas calibradas. En caso contrario, podría perderse reactivo y producirse un fallo en el ensayo.
- Todas las temperaturas deben mantenerse de manera precisa.
- Deje que las bolas magnéticas alcancen la temperatura ambiente antes de su uso.
- El producto amplificado puede almacenarse hasta 4 días a -20 °C antes de su uso. El producto amplificado puede congelarse y descongelarse una vez. Unos ciclos repetidos de congelación/descongelación pueden derivar en la degradación del producto amplificado y ofrecer unos resultados deficientes si se utiliza para generar bibliotecas.

### A. Purificación de ADN genómico

Purifique el ADN genómico con el método de su elección. Los requisitos para las muestras de ADN son los que figuran a continuación:

- Las muestras de ADN genómico deben extraerse de la sangre completa o el hisopo bucal con un método de extracción de ADN que pueda generar un ADN de alto peso molecular.
- El ADN debe diluirse en agua sin nucleasas y almacenarse a -20 °C o a una temperatura inferior.
- La concentración final de ADN debe ser de 5 a 15 ng/µl para sangre completa y de 2,5 a 7,5 ng/µl para muestras de hisopos bucales, además de mantenerse a niveles de concentración similares en todas las muestras. Si es necesario, ajuste con agua sin nucleasas.

- Al menos el 50 % de cada muestra de ADN genómico debe estar compuesto de fragmentos superiores a 10 kb y el cociente OD 260/280 debe encontrarse entre 1,65 y 2,0 para llevar a cabo una PCR de gran alcance correcta.

## B. Amplificación de ADN (PCR)

### Preparación para PCR para muestras de ADN de sangre completa

- Cree un archivo con códigos de barras de muestras utilizando el formato de valores separados por comas de Windows (.csv) con los nombres de muestras y las asignaciones de códigos de barras que se muestran en la **figura 1**. Incluya el nombre del proyecto y la posición del pocillo de cada muestra. Utilice el archivo con códigos de barras de muestras para crear un nuevo proyecto en el software MIA FORA NGS (consulte el manual del software MIA FORA NGS para obtener instrucciones detalladas). El nombre del proyecto generado se puede usar para poner nombres coherentes a las placas.

Placa adaptadora SR-800-00389

	A	C
1	ID de muestra	ID de código de barras
2	NTC	Código de barras_A01
3	Muestra 1	Código de barras_B01
4	Muestra 2	Código de barras_C01
5	Muestra 3	Código de barras_D01
6	Muestra 4	Código de barras_E01
7	Muestra 5	Código de barras_F01
8	Muestra 6	Código de barras_G01
9	Muestra 7	Código de barras_H01
10	Muestra 8	Código de barras_A02
11	Muestra 9	Código de barras_B02
12	Muestra 10	Código de barras_C02
13	Muestra 11	Código de barras_D02
14	Muestra 12	Código de barras_E02
15	Muestra 13	Código de barras_F02
16	Muestra 14	Código de barras_G02
17	Muestra 15	Código de barras_H02
18	Muestra 16	Código de barras_A03
19	Muestra 17	Código de barras_B03
20	Muestra 18	Código de barras_C03
21	Muestra 19	Código de barras_D03
22	Muestra 20	Código de barras_E03
23	Muestra 21	Código de barras_F03
24	Muestra 22	Código de barras_G03
25	Muestra 23	Código de barras_H03

Placa adaptadora SR-800-00402-03

1	Muestra	ID de código de barras
2	NTC	Placa 03_A01
3	Muestra 1	Placa 03_B01
4	Muestra 2	Placa 03_C01
5	Muestra 3	Placa 03_D01
6	Muestra 4	Placa 03_E01
7	Muestra 5	Placa 03_F01
8	Muestra 6	Placa 03_G01
9	Muestra 7	Placa 03_H01
10	Muestra 8	Placa 03_A02
11	Muestra 9	Placa 03_B02
12	Muestra 10	Placa 03_C02
13	Muestra 11	Placa 03_D02
14	Muestra 12	Placa 03_E02
15	Muestra 13	Placa 03_F02
16	Muestra 14	Placa 03_G02
17	Muestra 15	Placa 03_H02
18	Muestra 16	Placa 03_A03
19	Muestra 17	Placa 03_B03
20	Muestra 18	Placa 03_C03
21	Muestra 19	Placa 03_D03
22	Muestra 20	Placa 03_E03
23	Muestra 21	Placa 03_F03
24	Muestra 22	Placa 03_G03
25	Muestra 23	Placa 03_H03

Figura 1. Ejemplos de archivos con códigos de barras para 24 muestras

Nota: Para el archivo con códigos de barras de 96 muestras, utilice "Placa" y un número en lugar de "Código de barras" con el fin de indicar la placa adaptadora utilizada (es decir, Placa 03\_A01).

- Genere un proyecto en el software MIA FORA después de crear un archivo con códigos de barras de muestras que contenga los nombres de las muestras y los códigos de barras. El nombre del proyecto es necesario para el nombre de la serie del secuenciador.
- Programa un termociclador con el programa de amplificación de la **tabla 1** y póngale el nombre MIA\_FORA\_MFlex\_PCR\_WholeBloodDNA a este último. Utilice el ajuste de tapa calefactada.
- Con una placa de 96 pocillos con semifaldilla y cubierta dura, prepare una placa de muestras de ADN con 15 µl de muestra de hgADN por pocillo a una concentración de 5 a 15 ng/µl. El pocillo A1 debería ser de Tris-HCl de 10 mM con un pH de 8,0 de control sin cadena molde (NTC). En la **figura 2** que aparece a continuación, se puede observar un ejemplo de 24 muestras.
  - 8 muestras:** las muestras deben disponerse en la columna 1 de una placa de muestras de ADN.
  - 16 muestras:** las muestras deben disponerse en las columnas 1 y 2 de una placa de muestras de ADN.
  - 24 muestras:** las muestras deben disponerse en las columnas 1-3 de una placa de muestras de ADN.
  - 48 muestras:** las muestras deben disponerse en las columnas 1-6 de una placa de muestras de ADN.
  - 96 muestras:** las muestras deben disponerse en las columnas 1-12 de una placa de muestras de ADN.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	S08	S16									
B	S01	S09	S17									
C	S02	S10	S18									
D	S03	S11	S19									
E	S04	S12	S20									
F	S05	S13	S21									
G	S06	S14	S22									
H	S07	S15	S23									

Figura 2. Ejemplo de la disposición de la placa de ADN de 24 muestras y la placa de PCR

Tabla 1: Programa de amplificación para PCR de gran alcance: MIA\_FORA\_MFlex\_PCR\_WholeBloodDNA

Retención inicial	Ciclos (20)			Ext. final	Retención
	Desnaturalización	Alineación	Extensión		
98 °C/10 s	98 °C/30 s	60 °C/15 s	66 °C/10 m	66 °C/10 m	4 °C/∞

- Centrifugue brevemente la placa de muestras para llevar estas últimas al fondo.
- Descongele la mezcla maestra para PCR. Mezcle por inversión o vigorosamente mediante agitación vorticial y centrifugue el tubo. Si va a procesar 8 o 16 muestras, continúe al paso 7.  
**Nota:** Si va a procesar **24 muestras**, cree un reservorio en una tira de tubos para PCR de 0,2 ml realizando alícuotas de 51 µl de la mezcla maestra en cada pocillo. Si va a procesar **48 muestras**, cree un reservorio en una tira de tubos para PCR de 0,2 ml realizando alícuotas de 102 µl de la mezcla maestra. Si va a procesar **96 muestras**, cree un reservorio en una tira de tubos para PCR de 0,2 ml realizando alícuotas de 204 µl de la mezcla maestra.
- Dispense 15 µl de la mezcla maestra para PCR en cada pocillo de la placa de PCR (**importante: Dispense la mezcla maestra con cuidado para minimizar la introducción de burbujas**).
- Dispense 10 µl de muestras de ADN con una pipeta multicanal en la placa de PCR. El volumen total de la reacción de PCR es ahora de 25 µl (**importante: No mezcle durante la adición de ADN ni después de esta**).
- Selle la placa de PCR con la película adhesiva para PCR Accuseal.
- Centrifugue brevemente la placa de PCR para asegurarse de que todos los líquidos se centrifuguen hasta el fondo de los pocillos.
- Coloque la placa en el termociclador y ejecute el programa MIA\_FORA\_MFlex\_PCR\_WholeBloodDNA que se muestra en la **tabla 1**.
- Opcional:** realice una electroforesis en gel para el análisis de los productos de amplificación por tamaño. **Nota:** El bromuro de etidio es el colorante de gel de ácido nucleico fluorescente preferido.

### Preparación para PCR para muestras de ADN de hisopos bucales

Nota: Siga el mismo protocolo que para las muestras de ADN de sangre completa con los siguientes cambios:

- Programe un termociclador con el programa de amplificación de la **tabla 2** y póngale el nombre MIA\_FORA\_MFlex\_PCR\_BuccalDNA a este último. Utilice el ajuste de tapa calefactada.

Tabla 2: Programa de amplificación para PCR de gran alcance: MIA\_FORA\_MFlex\_PCR\_BuccalDNA

Retención inicial	Ciclos (25)			Ext. final	Retención
	Desnaturalización	Alineación	Extensión		
98 °C/10 s	98 °C/30 s	60 °C/15 s	66 °C/10 m	66 °C/10 m	4 °C/∞

- Con una placa de 96 pocillos con semifaldilla y cubierta dura, prepare una placa de muestras de ADN con 15 µl de muestra de hgADN por pocillo a una concentración de 2,5 a 7,5 ng/µl. El pocillo A1 debería ser de Tris-HCl de 10 mM con un pH de 8,0 de control sin cadena molde (NTC). En el caso de los tipos de muestras mixtas de hisopos bucales y ADN de la sangre, todo el proceso de amplificación se puede realizar en la misma placa durante 25 ciclos de PCR. El ADN de entrada para la sangre puede ser de hasta 10 ng/µl.

**PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO:** Los productos de PCR se pueden almacenar a -20 °C hasta 4 días.

### C. Generación de bibliotecas de secuenciación

Los productos de PCR se unen enzimáticamente en fragmentos, se reparan los extremos y se realiza su poliadenilación en el extremo 3' de modo que los fragmentos puedan ligarse al saliente 5'-T de cada adaptador de índices. Los fragmentos poliadenilados se limpian después con bolas magnéticas antes de la ligación al adaptador de índices. Los fragmentos ligados se agrupan en un único tubo para microcentrifuga y se limpian antes de la selección de los fragmentos de ADN con un rango de tamaño de 500 a 900 pares de bases. Después, los fragmentos seleccionados por tamaño se amplifican, limpian, cuantifican y preparan para la secuenciación de Illumina.

#### a. Preparación de biblioteca primaria: fragmentación, reparación de extremos y poliadenilación

- Prepare la mezcla maestra transfiriendo la mezcla enzimática primaria (tubo L1) y la mezcla de tampón primario (tubo L2) a un tubo para microcentrifuga según la **tabla 4**. Mezcle bien agitando vorticialmente y centrifugue un corto periodo de tiempo.
- Si va a procesar **8 o 16 muestras**, vaya al paso 4.
- Para **24 muestras**, pipetee 44 µl de la mezcla maestra preparada en el paso 1 en cada pocillo de la columna 12 de la placa de preparación primaria con el fin de crear una columna de "reservorio" de mezcla maestra. Para **48 muestras**, pipetee 82 µl de mezcla maestra en cada pocillo de la columna 12 de la placa de reparación primaria con el fin de crear una columna de

- "reservorio" de mezcla maestra. Para **96 muestras**, pipetee 150 µl de mezcla maestra en una tira de tubos para PCR de 0,2 ml con el fin de utilizarla como reservorio.
4. Transfiera la mezcla maestra a la placa de preparación primaria.
    - a. **8 muestras:** transfiera 11 µl de mezcla maestra del tubo para microcentrifuga a la columna 1 de la placa de preparación primaria.
    - b. **16 muestras:** transfiera 11 µl de mezcla maestra del tubo para microcentrifuga a las columnas 1 y 2 de la placa de preparación primaria.
    - c. **24 muestras:** transfiera 11 µl de mezcla maestra del reservorio de la columna 12 a las columnas 1-3 de la placa de preparación primaria.
    - d. **48 muestras:** transfiera 11 µl de mezcla maestra del reservorio de la columna 12 a las columnas 1-6 de la placa de preparación primaria.
    - e. **96 muestras:** transfiera 11 µl de mezcla maestra del reservorio de la tira de tubos para PCR de 0,2 ml a las columnas 1-12 de la placa de preparación primaria.
  5. Añada las muestras de ADN a la placa de preparación primaria.
    - a. **8 muestras:** transfiera 14 µl de muestra de la columna 1 de la placa de PCR a la columna 1 de la placa de preparación primaria. Mezcle aspirando y dispensando con una pipeta hasta 5 veces.
    - b. **16 muestras:** transfiera 14 µl de muestra de las columnas 1 y 2 de la placa de PCR a las columnas 1 y 2 de la placa de preparación primaria. Mezcle aspirando y dispensando con una pipeta hasta 5 veces.
    - c. **24 muestras:** transfiera 14 µl de muestra de las columnas 1-3 de la placa de PCR a las columnas 1-3 de la placa de preparación primaria. Mezcle aspirando y dispensando con una pipeta hasta 5 veces.
    - d. **48 muestras:** transfiera 14 µl de muestra de las columnas 1-6 de la placa de PCR a las columnas 1-6 de la placa de preparación primaria. Mezcle aspirando y dispensando con una pipeta hasta 5 veces.
    - e. **96 muestras:** transfiera 14 µl de muestra de las columnas 1-12 de la placa de PCR a las columnas 1-12 de la placa de preparación primaria. Mezcle aspirando y dispensando con una pipeta hasta 5 veces.
  6. Selle la placa de preparación principal con la película adhesiva para PCR Accuseal. Centrifugue bien (por ejemplo: a 2250 rpm durante 1 minuto).
  7. Transfiera la placa de preparación primaria a un termociclador y ejecute el programa MIA\_FORA\_FLEX\_PrimaryPrep que se muestra en la **tabla 3**.

**Tabla 3: Programa de termociclado para preparación primaria de bibliotecas**

<b>MIA FORA FLEX_PrimaryPrep</b>
20 °C durante 10 minutos
75 °C durante 30 minutos
4 °C ∞ en retención

**Tabla 4: Preparación de mezcla maestra para preparación primaria**

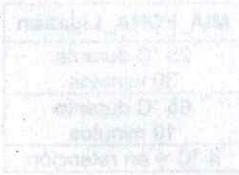
Tubo	Componente	Volumen por reacción (µl)	Volumen (µl)				
			8 muestras	16 muestras	24 muestras	48 muestras	96 muestras
L1	Mezcla enzimática primaria	1,5	16,5	28,5	49,5	90	165
L2	Mezcla de tampón primaria	9,5	104,5	180,5	313,5	570	1045

**PROCEDA INMEDIATAMENTE AL PASO DE LIMPIEZA CON BOLAS**

8. Agite suavemente el frasco de bolas magnéticas o dele vueltas con cuidado para homogeneizar la solución.
9. Si va a procesar **8 o 16 muestras**, vaya al paso 11.
10. Para **24 muestras**, pipetee 80 µl de bolas magnéticas en cada pocillo de la columna 11 de la placa de preparación principal con el fin de crear una columna de "reservorio" de bolas magnéticas. Para **48 muestras**, pipetee 160 µl de bolas magnéticas en cada pocillo de la columna 11 de la placa de preparación principal con el fin de crear una columna de "reservorio" de bolas magnéticas. Para **96 muestras**, pipetee 160 µl de bolas magnéticas en dos tiras de tubos para PCR de 0,2 ml (utilice la primera tira de tubos para las columnas 1-6 y la segunda para las columnas 7-12).
11. Añada bolas magnéticas a cada muestra fragmentada.
  - a. **8 muestras:** transfiera 20 µl de bolas magnéticas del frasco a la columna 1 de la placa de preparación principal. Mezcle succionando y dispensando con una pipeta hasta 10 veces.
  - b. **16 muestras:** transfiera 20 µl de bolas magnéticas del frasco a las columnas 1 y 2 de la placa de preparación primaria. Mezcle succionando y dispensando con una pipeta hasta 10 veces.
  - c. **24 muestras:** transfiera 20 µl de bolas magnéticas del reservorio de la columna 11 a las columnas 1-3 de la placa de preparación primaria. Mezcle succionando y dispensando con una pipeta hasta 10 veces.

- d. **48 muestras:** transfiera 20 µl de bolas magnéticas del reservorio de la columna 11 a las columnas 1-6 de la placa de preparación primaria. Mezcle succionando y dispensando con una pipeta hasta 10 veces.
  - e. **96 muestras:** transfiera 20 µl de bolas magnéticas de la primera tira de tubos para PCR a las columnas 1-6 de la placa de preparación primaria y 20 µl de bolas magnéticas de la segunda tira de tubos para PCR a las columnas 7-12 de la placa de preparación primaria. Mezcle succionando y dispensando con una pipeta hasta 10 veces.
12. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
  13. Transfiera la placa a la placa magnética Magnum FLX para unir las bolas a los lados de los pocillos.
  14. Deje la placa sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
  15. Mientras esté sobre el imán, aspire el sobrenadante con una pipeta multicanal sin alterar las bolas y deseche el sobrenadante.
  16. Deje la placa en el imán para los pasos de lavado con etanol.
    - a. Lave las bolas añadiendo 200 µl de etanol al 80 % a cada pocillo.
    - b. Incube durante 30 segundos en el imán.
    - c. Retire el etanol con una pipeta multicanal sin alterar las bolas.
  17. Repita el lavado con etanol 2 veces más hasta un total de 3 lavados.
  18. Elimine el exceso de líquido de los pocillos.
  19. Quite la placa del imán y deje que se seque al aire para evaporar el exceso de etanol hasta que las bolas adquieran un aspecto vídrio (~3 minutos).
  20. Asegúrese de que la placa esté fuera del imán y añada 25 µl de Tris-HCl de 10 mM con un pH de 8,0 a las bolas.
  21. Mezcle pipeteando un mínimo de 10 veces.
  22. Incube fuera del imán durante 5 minutos.
  23. Coloque la placa sobre el imán e incube durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
  24. Deje la placa en el imán y transfiera 23 µl de eluido sin alterar las bolas a la nueva placa con la etiqueta Proyecto\_LimpiezaPreparaciónPrincipal\_Fecha.

**PROCEDA DIRECTAMENTE AL PASO DE LIGACIÓN AL ADAPTADOR**



Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												

**b. Ligación al adaptador de índices**

1. Vuelva a etiquetar la placa llamada Principal\_Preparación\_limpieza\_fecha como Proyecto\_Ligación\_Fecha.
2. Programe un termociclador con las condiciones que se muestran en la **tabla 5**.
3. Descongele y centrifugue bien la placa adaptadora, por ejemplo, a 2250 rpm durante 1 minuto (importante: Utilice unos guantes nuevos mientras manipula la placa adaptadora). Retire con cuidado el adhesivo de la placa.
4. Para el kit de **24 muestras**:  
Si utiliza la **placa adaptadora SR-800-00389**, compruebe visualmente que todos los pocillos de las columnas 1-3 contengan alrededor de 8 µl de solución.  
Si utiliza una de las **placas adaptadoras desde la SR-800-00402-01 hasta la SR-800-00402-06**, compruebe visualmente que todos los pocillos contengan alrededor de 10 µl de solución. Puede emplearse para la ligación tres columnas cualquiera de las doce columnas llenas. No obstante, asegúrese de que los pocillos correspondientes estén identificados en el archivo con códigos de barras de muestras generado anteriormente (consulte la figura 1).  
Para el kit de **96 muestras**: verifique visualmente que todos los pocillos de la placa adaptadora contengan unos 10 µl de solución.
5. Prepare la mezcla maestra de ligación transfiriendo la enzima ligasa (tubo L3) y el tampón de ligasa (tubo L4) a un tubo para microcentrifuga según la **tabla 6**. Mezcle bien agitando vorticialmente y centrifugue un corto periodo de tiempo.
6. Si va a procesar **8 o 16 muestras**, vaya al paso 8.
7. Para **24 muestras**, pipetee 95 µl de la mezcla maestra preparada en el paso 2 en cada pocillo de la columna 12 de la placa de ligación con el fin de crear una columna de "reservorio" de mezcla maestra. Para **48 muestras**, pipetee 190 µl de la mezcla maestra preparada en el paso 2 en cada pocillo de la columna 12 de la placa de ligación con el fin de crear una columna de "reservorio" de mezcla maestra. Para **96 muestras**, pipetee 190 µl de la mezcla maestra preparada en el paso 2 en dos tiras de tubos para PCR de 0,2 ml (utilice la primera tira de tubos para las columnas 1-6 y la segunda para las columnas 7-12).
8. Transfiera la mezcla maestra a la placa de ligación.
  - a. **8 muestras**: transfiera 26 µl de mezcla maestra del tubo para microcentrifuga a cada pocillo de la columna 1 de la placa de ligación. Mezcle aspirando y dispensando con una pipeta hasta 5 veces.
  - b. **16 muestras**: transfiera 26 µl de mezcla maestra del tubo para microcentrifuga a cada pocillo de las columnas 1 y 2 de la placa de ligación. Mezcle aspirando y dispensando con una pipeta hasta 5 veces.
  - c. **24 muestras**: transfiera 26 µl de la mezcla maestra del reservorio de la columna 12 a cada pocillo de las columnas 1-3 de la placa de ligación. Mezcle aspirando y dispensando con una pipeta hasta 5 veces.
  - d. **48 muestras**: transfiera 26 µl de la mezcla maestra del reservorio de la columna 12 a cada pocillo de las columnas 1-6 de la placa de ligación. Mezcle aspirando y dispensando con una pipeta hasta 5 veces.
  - e. **96 muestras**: transfiera 26 µl de mezcla maestra de la primera tira de tubos para PCR a cada pocillo de las columnas 1-6 de la placa de ligación y 26 µl de mezcla maestra de la segunda tira de tubos para PCR a cada pocillo de las columnas 7-12. Mezcle aspirando y dispensando con una pipeta hasta 5 veces.
9. Transfiera 8 µl/pocillo de las columnas adaptadoras apropiadas a los pocillos correspondientes de la placa de ligación. Mezcle aspirando y dispensando con una pipeta hasta 5 veces después de cada adición (**importante: Vuelva a sellar los adaptadores no utilizados y congélelos inmediatamente en posición vertical**).
10. Selle la placa de ligación con la película adhesiva para PCR Accuseal. Centrifugue bien (por ejemplo: a 2250 rpm durante 1 minuto).
11. Transfiera la placa de ligación a un termociclador y ejecute el programa MIA\_FORA\_Ligation que se muestra en la **tabla 5**.

**Tabla 5: Programa de termociclado para ligación al adaptador**

MIA_FORA_Ligation
25 °C durante 30 minutos
65 °C durante 10 minutos
4 °C ∞ en retención

**Tabla 6: Preparación de componentes y mezcla maestra para ligación al adaptador**

Tubo	Componente	Por reacción	Volumen (µl)				
			8 muestras	16 muestras	24 muestras	48 muestras	96 muestras
L3	Enzima ligasa	1	10	20	30	60	120
L4	Tampón de ligasa	25	250	500	750	1500	3000
Placa adaptadora	Adaptadores de índices, 2,5 µM	8					

### c. Consolidación de los productos ligados al adaptador y selección de tamaño

1. Consulte la **tabla 7** para conocer el volumen apropiado que se puede combinar según el número de muestras procesadas en un solo tubo Eppendorf de 2,0 ml con la etiqueta Proyecto\_Consolidación\_Fecha.
2. Tras la agrupación, compruebe visualmente la placa original para confirmar que se han incluido todas las muestras.
3. Pipetee bolas magnéticas en el tubo de muestra consolidado de acuerdo con la **tabla 7** (el volumen de las bolas debe ser 0,6x el volumen de muestra).
4. Mezcle bien pipeteando 10 veces.
5. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
6. Transfiera el tubo para microcentrifuga a un imán DynaMag-2 y deje el tubo sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
7. Retire y deseche el sobrenadante sin alterar las bolas.
8. Deje la placa en el imán para los pasos de lavado con etanol.
  - a. Lave las bolas añadiendo 1 ml de etanol al 80 % al tubo.
  - b. Incube durante 30 segundos en el imán.
  - c. Retire el etanol con una pipeta multicanal sin alterar las bolas.
9. Repita el lavado con etanol 2 veces más hasta un total de 3 lavados.
10. Quite el exceso de etanol del tubo y deje que se seque al aire para evaporar dicho exceso hasta que las bolas adquieran un aspecto vídrioso (~5 minutos).
11. Retire el tubo del imán, vuelva a suspender las bolas en 63 µl de Tris-HCl de 10 mM con un pH de 8,0 y mezcle con una pipeta 10 veces.
12. Incube durante 5 minutos.
13. Coloque el tubo sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
14. Deje el tubo en el imán y transfiera 60 µl de eluido sin alterar las bolas a un nuevo tubo para microcentrifuga etiquetado (ya sea con la etiqueta Proyecto\_LimpiezaConsolidada\_Fecha si utiliza la selección de tamaño con Pippin o Proyecto\_SelecciónTamañoSegúnBolas\_Fecha si emplea la selección de tamaño basada en bolas).

**Si va a realizar la selección de tamaño con Pippin, continúe con el apartado Selección de tamaño (Pippin Prep) que figura más adelante. Si va a efectuar la selección de tamaño con bolas, prosiga con el apartado Selección de tamaño (limpieza con bolas 0,8x) siguiente.**

#### Selección de tamaño (limpieza con bolas 0,8x)

1. Pipetee 48 µl de bolas magnéticas en el tubo con la etiqueta Proyecto\_SelecciónTamañoSegúnBolas\_Fecha.
2. Mezcle con una pipeta 10 veces e incube durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Transfiera el tubo para microcentrifuga a un imán DynaMag-2 y deje el tubo sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
4. Retire y deseche el sobrenadante sin alterar las bolas.
5. Deje la placa en el imán para los pasos de lavado con etanol.
  - d. Lave las bolas añadiendo 1 ml de etanol al 80 % al tubo.
  - e. Incube durante 30 segundos en el imán.
  - f. Retire el etanol con una pipeta multicanal sin alterar las bolas.
6. Repita el lavado con etanol 2 veces más hasta un total de 3 lavados.
7. Quite el exceso de etanol del tubo y deje que se seque al aire para evaporar dicho exceso hasta que las bolas adquieran un aspecto vídrioso (~5 minutos).
8. Retire el tubo del imán, vuelva a suspender las bolas en 63 µl de Tris-HCl de 10 mM con un pH de 8,0 y mezcle con una pipeta 10 veces.
9. Incube durante 5 minutos.
10. Coloque el tubo sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
11. Deje el tubo en el imán y transfiera 60 µl de eluido sin alterar las bolas a un nuevo tubo para microcentrifuga con la etiqueta Proyecto\_LimpiezaConsolidación\_Fecha.

#### **PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO:**

Las muestras limpias, consolidadas y ligadas al adaptador (biblioteca) pueden almacenarse a -20 °C durante un máximo de 4 días.

**Tabla 7: Volumen de bolas y consolidación (0,6x)**

Número de muestras	Volumen de cada muestra (µl)	Volumen total de las muestras (µl)	Volumen de las bolas magnéticas (µl)
8	50	400	240
16	36	576	345
24	24	576	345
32	18	576	345
48	12	576	345
96	6	576	345

### Selección de tamaño (Pippin Prep)

1. La muestra se purifica mediante el sistema Pippin Prep, que selecciona fragmentos de ADN con el rango de tamaño deseado (500-900 pares de bases). Consulte el manual de instrucciones de Pippin Prep (guía rápida para el casete de gel de agarosa al 1,5 %) para obtener más indicaciones. La duración del procesamiento del protocolo es de aproximadamente 45 minutos.
2. Lleve el tampón de electroforesis Pippin y la mezcla de marcadores a temperatura ambiente.
3. Calibre el sistema Pippin Prep.
4. Abra la bolsa del casete e inspeccione este último. Elimine las burbujas que fluyen libremente cerca de las cámaras de elución dando pequeños golpecitos en el extremo del casete.
5. Quite las tiras adhesivas y compruebe los niveles de tampón en los pocillos de muestras. Los pocillos de muestras deben estar completamente llenos de tampón. Añada tampón si es necesario.
6. Retire todo el líquido de cada cámara de elución con una pipeta de punta estrecha y sustitúyalo por 40 µl de tampón de electroforesis nuevo.
7. Coloque el casete en el instrumento Pippin Prep y cierre la puerta.
8. Seleccione "Test" (Ensayo) para comprobar si los niveles actuales son aceptables.
9. Si el casete supera la comprobación, quítelo del instrumento y proceda al paso 10. Si alguno de los carriles falla, repita los pasos del 5 al 8.
10. Selle las cámaras de elución con la tira adhesiva suministrada. Presione firmemente las cámaras de elución para asegurarse de que el sellado sea hermético.
11. Mezcle 30 µl de la biblioteca limpia y agrupada con 10 µl de la mezcla de marcadores del sistema Pippin Prep.
12. Vuelva a comprobar los niveles de tampón en los pocillos de muestras (añada más si es necesario). El volumen total del pocillo de muestras es de ~70 µl.
13. Etiquete los pocillos del casete con el nombre de la biblioteca y la fecha del procesamiento.
14. Retire y deseche 40 µl de tampón de los pocillos de muestras que se van a utilizar y sustitúyalos por 40 µl de la muestra preparada en el paso 11.
15. Prepare el protocolo del instrumento Pippin seleccionando la pestaña "Protocol Editor" (Editor de protocolo) y proceda de la siguiente manera:
  - Elija "Range" (Rango) para los carriles de muestras.
  - Introduzca un rango de 500 a 900 pares de bases.
  - Añada los nombres de las muestras.

**IMPORTANTE:** Seleccione "Off" (Desactivado) en los carriles que no se utilicen.

- Asegúrese de que los valores de "Ref Lane" (Carril de referencia) coincidan con los números de los carriles.
  - Guarde el protocolo como "HLA 500-900". Este protocolo puede utilizarse para futuros procesados.
  - Cierre la puerta del instrumento y seleccione "START" (INICIAR).
  - Aparecerán luces verdes junto a los carriles para indicar el comienzo de la electroforesis.
16. Después de aproximadamente 45 minutos la barra de progreso se detendrá y el botón "STOP" (DETENER) se verá atenuado, lo que señala que ha finalizado la elución.
  17. Retire la cinta adhesiva de la cámara de elución y transfiera la biblioteca (un total de aproximadamente 40 µl) a un tubo para microcentrífuga limpio con la etiqueta Proyecto\_TrasPippin\_Fecha.
  18. Deseche el casete si se han usado todos los carriles. Si hay carriles que no se hayan utilizado, selle toda la parte superior del casete con cinta adhesiva, envuélvalo en su embalaje original y guárdelo a temperatura ambiente para su posible uso en el futuro.
  19. Deje la puerta del instrumento abierta.  
**Nota:** Consulte las actualizaciones del software y la guía de usuario proporcionadas por Sage Sciences para conocer el protocolo más reciente.

### d. Amplificación de biblioteca seleccionada por tamaño

1. El eluido seleccionado por tamaño se amplifica con los cebadores de Illumina que contienen las secuencias necesarias para la generación de grupos. Se suministran suficientes componentes para cuatro (4) amplificaciones.
2. Descongele los reactivos en hielo y ensamble los componentes que figuran en la **tabla 8** en un tubo para PCR de 0,2 ml.
3. Asegúrese de que el tubo esté bien sellado y centrifugue brevemente.
4. Transfiera el tubo para amplificación a un termociclador y ejecute el programa MIA\_FORA\_Library\_PCR que se muestra en la **tabla 9**.

**Tabla 8: Componentes para amplificación**

Tubo	Componente	Volumen por reacción (µl)
L5	Mezcla de tampón/enzima para PCR	25
L6	Cebador de amplificación F 25 µM Cebador de amplificación R 25 µM	1
L7	Agua sin nucleasas	9
	Biblioteca seleccionada por tamaño	15
	Volumen total	50

Tabla 9: MIA FORA\_Library\_PCR

Ciclo (1)	Ciclos (12)			Ciclo (1)	
Retención inicial	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Ext. final	Retención
98 °C/30 s	98 °C/15 s	65 °C/30 s	72 °C/30 s	72 °C/5 m	4 °C/∞

e. Preparación para secuenciación

NOTA: Este paso posterior a la amplificación debe realizarse en una sala de secuenciación o en una zona separada de la preparación de bibliotecas, preferiblemente en una caja para PCR AirClean para evitar la contaminación de ADN ligado al adaptador de índices con productos finales que contienen las secuencias de grupos de Illumina.

**Limpieza con bolas de ADN después de la amplificación (0,7x para la selección de tamaño con Pippin y 0,3x [limpieza de sobrenadantes]/0,5x para la selección de tamaño basada en bolas)**

1. Transfiera 50 µl de la biblioteca amplificada a un tubo para microcentrifuga.

**Si se utilizó el sistema Pippin:**

2. Pipetee 35 µl de bolas magnéticas (0,7x) y mezcle con una pipeta 10 veces.
3. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Transfiera el tubo para microcentrifuga a un imán DynaMag-2 y deje el tubo sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
5. Retire y deseche el sobrenadante sin alterar las bolas.
6. Deje la placa en el imán para los pasos de lavado con etanol.
  - a. Lave las bolas añadiendo 1 ml de etanol al 80 % al tubo.
  - b. Incube durante 30 segundos en el imán.
  - c. Retire el etanol con una pipeta multicanal sin alterar las bolas.
7. Repita el lavado con etanol 2 veces más hasta un total de 3 lavados.
8. Quite el exceso de etanol del tubo y deje que se seque al aire para evaporar dicho exceso hasta que las bolas adquieran un aspecto vidrioso (~3 minutos).
9. Retire el tubo del imán, vuelva a suspender las bolas en 20 µl de Tris-HCl de 10 mM con un pH de 8,0 y mezcle con una pipeta 10 veces.
10. Incube durante 5 minutos.
11. Coloque el tubo sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
12. Deje el tubo en el imán y transfiera 18 µl de eluido sin alterar las bolas a un nuevo tubo para microcentrifuga con la etiqueta Proyecto\_LimpiezaBiblioteca\_Fecha.

**Si se utiliza la selección de tamaño basada en bolas:**

2. Pipetee 15 µl de bolas magnéticas (0,3x) y mezcle con una pipeta 10 veces.
3. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Transfiera el tubo para microcentrifuga a un imán DynaMag-2 y deje el tubo sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
5. **Retire 50 µl del sobrenadante sin alterar las bolas y transfíralos a otro tubo para microcentrifuga limpio. NO DESECHE EL SOBRENADANTE.**
6. Añada 25 µl (0,5x) de bolas magnéticas al sobrenadante y mezcle con una pipeta 10 veces.
7. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
8. Transfiera el tubo para microcentrifuga a un imán DynaMag-2 y deje el tubo sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
9. Retire y deseche el sobrenadante sin alterar las bolas.
10. Deje la placa en el imán para los pasos de lavado con etanol.
  - a. Lave las bolas añadiendo 1 ml de etanol al 80 % al tubo.
  - b. Incube durante 30 segundos en el imán.
  - c. Retire el etanol con una pipeta multicanal sin alterar las bolas.
11. Repita el lavado con etanol 2 veces más hasta un total de 3 lavados.
12. Quite el exceso de etanol del tubo y deje que se seque al aire para evaporar dicho exceso hasta que las bolas adquieran un aspecto vidrioso (~3 minutos).
13. Retire el tubo del imán, vuelva a suspender las bolas en 20 µl de Tris-HCl de 10 mM con un pH de 8,0 y mezcle con una pipeta 10 veces.
14. Incube durante 5 minutos.
15. Coloque el tubo sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
16. Deje el tubo en el imán y transfiera 18 µl de eluido sin alterar las bolas a un nuevo tubo para microcentrifuga con la etiqueta Proyecto\_LimpiezaBiblioteca\_Fecha.

### PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO:

Las muestras eluidas se pueden almacenar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta 4 días.

#### Quantificación de productos de PCR mediante el sistema Qubit

1. Asegúrese de que todos los reactivos del análisis estén a temperatura ambiente antes de iniciar el procedimiento.
2. Prepare el análisis según la guía rápida del sistema Qubit.
3. Calcule la concentración inicial de la biblioteca de secuenciación e introduzca el valor en la **tabla 10**.

**Tabla 10: Cálculo de la concentración de la biblioteca**

Biblioteca	Concentración inicial (nM)	Volumen de muestra para biblioteca de secuenciación de 4 nM ( $\mu\text{l}$ )	Volumen de Tris-HCl de 10 mM con un pH de 8,0 para biblioteca de secuenciación de 4 nM ( $\mu\text{l}$ )	Concentración final deseada para MiSeq (pM)	Volumen de biblioteca de secuenciación desnaturalizada de 40 pM para 1000 $\mu\text{l}$ de 10 pM ( $\mu\text{l}$ )	Volumen de HT1 que añadir ( $\mu\text{l}$ )
Ejemplo	250	3,2	196,8	10	250	750
Biblioteca del usuario				10	250	750

**Nota:** Debido a la naturaleza de los kits de Illumina, la concentración de las bibliotecas de secuenciación debe ser preferiblemente superior a 10 nM.

#### Determinación de los métodos de distribución de tamaño de la biblioteca (opcional)

1. La distribución de tamaño de la biblioteca puede determinarse mediante electroforesis en gel de agarosa o cualquier sistema de electroforesis capilar (por ejemplo, el kit de ADN 1000 Agilent en el bioanalizador Agilent 2100).

#### Preparación y carga de la muestra en los secuenciadores de Illumina

1. Utilice el kit de reactivos de MiSeq v2, 300 ciclos (MS-102-2002); el kit de rendimiento medio de MiniSeq, 300 ciclos (FC-420-1004); o el reactivo i1 de iSeq 100, 300 ciclos, kit de reactivos de un solo uso (Illumina, n.º de cat. 20021533).
2. Verifique que el secuenciador disponga de suficiente espacio libre en la unidad D:/ del instrumento (al menos 100 GB de espacio libre en el caso de MiSeq y MiniSeq, y 10 GB en el de iSeq). Si no es así, elimine o transfiera archivos para obtener más espacio.
3. Genere el nombre del proyecto de secuenciación con el software MIA FORA NGS iniciando un nuevo proyecto con el archivo CSV con códigos de barras de muestras (**figura 1**). Use este nombre para preparar un procesado en Illumina Experiment Manager.

#### f. Análisis de datos

Los archivos bcl/fastq generados por el instrumento de secuenciación deben analizarse con el software MIA FORA para generar la tipificación del HLA. La hoja de muestras con los nombres de muestras y los códigos de barras, así como los archivos bcl/fastq correspondientes, deben cargarse en el archivo de proyecto del software MIA FORA. Para obtener información sobre el uso del software MIA FORA, siga la guía del usuario del software.

## RESULTADOS

1. Amplificación mediante PCR:  
El análisis del gel de agarosa no debe mostrar ningún producto en el control negativo (NTC) para que el análisis se considere válido.
2. Preparación de bibliotecas:  
La concentración final de la biblioteca debe ser al menos de 10 nM y debe estar cuantificada de manera precisa antes de la secuenciación. Las bibliotecas deben diluirse hasta 4 nM antes de la desnaturalización.  
La agrupación en los kits MiSeq® y MiniSeq® puede variar en función de la precisión de la cuantificación. Normalmente, las densidades de grupos de las bibliotecas de 8 a 12 pM deben oscilar entre los 600 y los 1000 k/mm<sup>2</sup> en el MiSeq® y las densidades de grupos de las bibliotecas de 1,3 pM deben oscilar entre los 160 y los 220 k/mm<sup>2</sup> en el MiniSeq®. Nota: No se espera un rango de densidad de grupo para una biblioteca típica (50 pM) en el iSeq 100, ya que la distribución de grupos en la celda de flujo está preestablecida con el uso de la tecnología de celdas de flujo con patrones.  
*Debe tener cuidado para cuantificar de manera precisa la biblioteca. Todos los productos posteriores a la ligación al adaptador deben mantenerse bajo una campana para PCR o en un área designada para tal fin, y deben prepararse nuevos reactivos de dilución para evitar cualquier contaminación.*
3. La tipificación del HLA la genera el software MIA FORA NGS y se proporciona en un informe. Siga la Guía del usuario del software MIA FORA para obtener información sobre el análisis de los datos de tipificación del HLA.

## CONTROL DE CALIDAD

Es necesario procesar un control negativo y un control conocido opcional con cada ensayo, como un blanco de agua y una muestra tipificada con anterioridad, respectivamente. Extreme la precaución cuando retire los sellos de las placas, las cuales deben centrifugarse antes de su apertura. En cada paso debe utilizar sellos para placas nuevos, en los casos en que estas deban sellarse. Las puntas de pipeta utilizadas deben colocarse en los recipientes correspondientes y desecharse. La disposición para PCR debe realizarse en una sala para pasos previos a la PCR separada del lugar donde se manipulan los productos amplificados. Todo el ADN genómico debe diluirse en agua sin nucleasas. Después de la amplificación y la selección de tamaño de ADN, la biblioteca amplificada debe manipularse en una zona separada, preferiblemente una campana para PCR, y manipularse con un conjunto separado de pipetas. Debe tener cuidado de no contaminar las zonas de trabajo con bibliotecas amplificadas. El ensayo debe procesarse según las recomendaciones de este prospecto, así como llevarse a cabo con otros procedimientos de control de calidad conformes a los requisitos de los organismos locales, estatales, federales o de acreditación.

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Se recomienda encarecidamente que estos kits se validen en el laboratorio antes de la implementación utilizando muestras con una tipología conocida.
2. La PCR y el ensayo descritos en este prospecto requieren condiciones controladas de manera precisa. Cualquier desviación de los parámetros que se hayan validado puede traducirse en un fallo del producto.
3. Si al menos el 50 % de los fragmentos de ADN iniciales es inferior a 10 kb, puede que no se genere una cantidad suficiente de producto de PCR de gran alcance.
4. Si la concentración de la biblioteca final es inferior a 10 nM, puede que no se obtengan resultados de secuenciación precisos.
5. Se observarán ambigüedades en el 4.º campo debido a la falta de cobertura en la región del intrón. Se ha validado la precisión de la tipificación del HLA hasta el 3.º campo.
6. Deberán utilizarse el bromuro de etidio o GelRed™ para la visualización de los productos de PCR.
7. Las regiones cubiertas por los exones amplificados por los cebadores se utilizan para determinar la tipificación del HLA. El software informará de ambigüedades conocidas debido a la falta de cobertura del exón 1 y el exón 5 de DPB1, el exón 6 de DQB1, las primeras bases del exón 2 y 4 de DPB1, y el exón 6 de DRB1, y las últimas bases del exón 4 de DPA1. El software no detectará ningún alelo nuevo en estas regiones.
8. La falta de secuencias de referencia genómica para DPB1 y los bajos niveles de polimorfismo en el intrón 2 (entre el exón 2 y 3) pueden dar como resultado una ambigüedad de fase que no pueda resolverse y se informará de ella en función de la versión de la base de datos del software.
9. Los locus de DRB se amplifican como dos fragmentos: uno que amplifica el exón 1 y otro que amplifica los exones 2 a 6. El intrón 1 no se amplifica en su totalidad. Por lo tanto, el ajuste de fase de todo el locus no es posible para DRB1/3/4/5.
10. En la mayoría de los casos, los productos de amplificación del exón 1 de DRB1/3/4/5 se asignan de manera deficiente al exón 1 de las secuencias de referencia conocidas de DRB5; por ello, es muy probable que no se genere el cóntigo del exón 1 para DRB5. Dado que no hay polimorfismos del exón 1 conocidos para DRB5, no se generará ninguna ambigüedad en la tipificación del HLA para DRB5.
11. En el caso en el que DRB4 esté infrarrepresentado en los datos, puede que el software no detecte automáticamente la tipificación y muy a menudo se puede contar con la asignación para confirmar qué alelo DRB4 está presente. La tipificación de DRB1 puede usarse para comprobar la presencia o ausencia del DRB4. En el caso en el que no puedan determinarse los alelos, se requiere confirmación de tipificación de DRB4 adicional. Debido a la región de borrado de DRB4\*03:01N, este alelo no se puede detectar.
12. La falta de polimorfismos en una región de determinadas combinaciones de alelos de genes de clase I y clase II del HLA puede dificultar la determinación de la fase correcta para muestras heterocigóticas. Esto se debe a que la longitud de las lecturas de secuenciación en la plataforma de secuenciación no es lo suficientemente larga como para captar los polimorfismos distantes en la lectura de la secuenciación de par final. Por consiguiente, puede que haya una ambigüedad de fase que no se pueda resolver.
13. Debido a la naturaleza compleja de la tipificación del HLA, la revisión de la interpretación de los datos y las asignaciones de tipificación deben realizarse personal cualificado. Debe prestarse especial atención al revisar las determinaciones homocigóticas para asegurarse de que el software no haya pasado por alto un segundo alelo y deben revisarse los alelos nulos para comprobar la asignación.
14. La guía de usuario del software cuenta con las mejores prácticas recomendadas e instrucciones detalladas sobre el uso del software, así como directrices sobre combinaciones complejas de tipificación del HLA.

## CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO

Se realizaron estudios clínicos en tres centros para evaluar el rendimiento del kit de tipificación del HLA MIA FORA NGS HLA Typing Kit. El rendimiento del ensayo se comparó con tipificaciones previas que incluyeron la tipificación basada en la secuencia (SBT) de alta resolución, si estaba disponible, y una tipificación de menor resolución cuando la SBT no estaba disponible. Las muestras las seleccionaron los centros de ensayo para representar un conjunto variado de diferentes tipos de HLA que pueden encontrarse durante el transcurso de operaciones normales. En los centros, se analizaron un total de 206 muestras en 3 series junto con dos lotes de reactivos en cada una. Se determinó la tipificación del HLA para los locus HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 y HLA-DRB 1/3/4/5. Se evaluó un total de 3692 alelos con estas 206 muestras. Los resultados mostraron que los tipos de HLA obtenidos mediante el ensayo MIA FORA, sin repetir el ensayo en locus discordantes o fallos, presentaban una concordancia del 99,34 %. Tras repetir el ensayo en los locus con fallos o discordantes, la concordancia general fue del 99,74 %.

Nota: Los datos siguientes representan el rendimiento del MIA FORA NGS HLA Typing Kit (kit de tipificación del HLA) original. No se han realizado nuevos estudios clínicos con el kit MIA FORA MFlex; no obstante, el análisis de MFlex se validó rigurosamente con respecto al producto MIA FORA original y se determinó que el rendimiento era equivalente en todos los estudios realizados.

**Tabla 8: Resumen de concordancia general**

Centro	Número de muestras	Número de locus analizados	Número de alelos para análisis de concordancia	Concordancia tras repetición de ensayo
Centro 1	68	748	1223	1220 (99,75 %)
Centro 2	69	759	1064	1063 (99,91 %)*
Centro 3	69	759	1241	1236 (99,59 %)

\* En este centro no se repitieron los ensayos. Un locus de DQB1 no mostró datos suficientes.

**Tabla 9: Resumen de ensayos clínicos por locus**

Locus de HLA	Concordancia inicial	Concordancia tras repetición de ensayo**
HLA-A	100,00 %	100,00 %
HLA-B	99,76 %	99,76 %
HLA-C	99,51 %	100,00 %
DPA1	99,77 %	100,00 %
DPB1	99,44 %	99,72 %
DQA1	99,26 %	100,00 %
DQB1	98,40 %	99,27 %
DRB1	98,54 %	99,03 %
DRB3/4/5	99,43 %	100,00 %
<b>Total</b>	<b>99,34 %</b>	<b>99,74 %</b>

\*\* Las repeticiones de los ensayos incluyeron llamadas que se marcaron para su revisión y que no pudieron resolverse con una inspección manual de los datos. Las llamadas que no pudieron realizarse debido a datos insuficientes (11/1854 amplificaciones) también se volvieron a analizar.

**NOTA:** Para obtener información detallada sobre características de rendimiento específicas, llame a Immucor, Inc. al (855) 466-8267.

Paula Zucchini  
Farmacéutica  
M.N. 12.855

HEMOMEDICA S.R.L.  
JUSTINO A. REINOSO

## SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	CAUSA POSIBLE		SOLUCIÓN
No hay bandas en el gel después de la amplificación mediante PCR	Cantidad o calidad del ADN	Cociente OD 260/280 inferior a 1,65	Vuelva a purificar el ADN para eliminar cualquier impureza.
		ADN fragmentado Al menos el 50 % del ADN debe ser mayor de 10 kb	Vuelva a extraer el ADN de la muestra.
		ADN diluido en Tris-HCl o TE	Diluya las muestras en agua.
		Baja concentración de plantilla de ADN	Asegúrese de que la concentración de ADN es de 50 a 150 ng/reacción.
		Pérdida de amplificación	Repita la PCR para las pérdidas de amplificación con reactivos sobrantes, que tengan volumen suficiente para cuatro muestras. Los reactivos sobrantes almacenados a 2-8 °C son estables durante una semana.
Varias bandas o trazas de bandas tras la amplificación mediante PCR	Condiciones del termociclador	Velocidades de aumento	Asegúrese de que las velocidades de aumento son las especificadas en el protocolo.
		Temperatura	Calibre la máquina de PCR para verificar el rendimiento de las máquinas de PCR.
		Calidad del ADN	Asegúrese de que el ADN está diluido en agua y sin contaminantes.
Selección de tamaño de ADN incorrecta	Instrumento Pippin	Compruebe el perfil de elución para asegurarse de que la elución se ha producido sin errores.	Si a la guía de solución de problemas de Sage Science para determinar si el rendimiento del instrumento cumple las especificaciones.
		Instrumento no calibrado	Procese 2 µl de 1 kb junto con cadena (ThermoFisher) con un protocolo de escisión de 400 a 600 pares de bases. Procese 15 µl de producto eluido en gel de agarosa para visualizar la elución de un fragmento de 500 pb.
		Reutilización de cartucho Pippin	El cartucho Pippin solo debe utilizarse una vez.
Selección de tamaño de ADN incorrecta	Selección de tamaño basada en bolas	Baja concentración de biblioteca	Asegúrese de que los volúmenes especificados en la guía del usuario para la selección basada en bolas se sigan cuidadosamente. Un volumen de bolas incorrecto generará una gran cantidad de fragmentos más pequeños.
Baja concentración de biblioteca amplificada	Limpieza con bolas magnéticas	Etanol no eliminado por completo	Retire el etanol con las placas sobre el soporte magnético. Retire todas las trazas de etanol, especialmente después del lavado final.
		Bolas almacenadas incorrectamente	Almacene las bolas a una temperatura entre 2 y 8 °C: NO LAS CONGEELE.
		El etanol no está recién preparado	Debe preparar etanol al 80 % fresco antes de cada uso.
		Sobresecado de bolas	El tiempo de secado puede depender de la humedad y de la temperatura ambiente. Vigile estrechamente las bolas para asegurarse de que estas no se sequen en exceso y ajuste el protocolo según sea necesario.
	Se ha empleado una concentración incorrecta de Tris-HCl	Asegúrese de que el tampón de Tris-HCl es de 10 mM y que tiene un pH de 8,0.	
	Pippin Prep no eluye el ADN	Compruebe la presencia de productos ligados al adaptador antes y después de la elución.	Amplifique 1 µl de biblioteca limpia agrupada previa al procesamiento con Pippin con la mitad de la cantidad de reactivos para la amplificación de bibliotecas. Procese los productos amplificados (no es necesario llevar a cabo una purificación) en un gel de agarosa al 2 % para determinar la presencia de muestras de fragmentos.
		Producto amplificado perdido durante la limpieza con bolas	Vuelva a amplificar 15 µl de elución. Si la biblioteca es > 25 nM, los productos pueden visualizarse procesando 5 µl en un gel de agarosa.
Error en la fragmentación a través de los pasos de ligación	Problemas de fragmentación	Purifique 20 µl de 2-3 muestras ligadas y el NTC con el protocolo de limpieza con bolas usando bolas de 36 µl. Eluya los productos en 10 µl y compruebe si hay fragmentación en un gel de agarosa al 2 %. Si no se ha producido la fragmentación, llame al servicio de asistencia técnica para obtener instrucciones para solucionar el problema.	
Agrupación inferior a lo esperado	Cuantificación de bibliotecas incorrecta	Fluorómetro Qubit	Siga las instrucciones del fabricante prestando especial atención a las diluciones y empleando nuevas diluciones de patrón. Si la concentración de muestra cae por debajo de la curva del patrón de los reactivos de amplio rango, repita el análisis con el ensayo de alta sensibilidad.
	Reactivos de Illumina	Problemas con la celda de flujo, el instrumento o los reactivos	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina para solucionar los problemas con los reactivos y los instrumentos.

## LIMITACIÓN DE LA LICENCIA

**IMPORTANTE. LEA DETENIDAMENTE:** Este Acuerdo de licencia de etiquetado ("Acuerdo") es el acuerdo legal entre usted (de aquí en adelante, "Licenciario") e Immucor Transplant Diagnostics, Inc. ("Immucor") (de manera individual, una "Parte" o en conjunto, las "Partes") para el uso de los reactivos proporcionados con este documento ("Reactivos"). A través del uso de los Reactivos, el Licenciario acepta vincularse a los términos dispuestos en este Acuerdo.

1. Uso de reactivos por parte del Licenciario. Immucor concede al Licenciario el derecho no exclusivo e intransferible a utilizar exclusivamente la cantidad transferida de los Reactivos únicamente de acuerdo con los procedimientos dispuestos en el etiquetado adjunto y sujeto a las limitaciones dispuestas en este Acuerdo. La titularidad de los Reactivos no se transferirá al Licenciario. Immucor conserva todos los demás derechos no concedidos de manera expresa en este Acuerdo, ni concede ninguna otra licencia implícita.
2. Usos excluidos. En virtud de este Acuerdo no se concede ningún permiso al Licenciario para que utilice los Reactivos que no sean los designados en la Sección 1 de este Acuerdo. Específicamente, no se concede ningún permiso al Licenciario para que utilice los Reactivos con el objeto de transferir, vender, divulgar o proporcionar acceso de cualquier otra forma a los Reactivos o al producto Mia Fora a terceros. El Licenciario no tendrá derecho a producir derivados de ningún Reactivo ni a autorizar a terceros a que utilicen o vendan ningún Reactivo ni derivados de los Reactivos. El Licenciario reconoce que algunos Reactivos y sus usos están sujetos a patentes de terceros y que estos son utilizados bajo licencia por Immucor. El Licenciario no deberá utilizar los Reactivos, excepto para los usos permitidos de manera explícita dispuestos en este Acuerdo.
3. Términos de indemnización y de uso indebido de Reactivos. Conforme a lo dispuesto por ley, el Licenciario defenderá, indemnizará y exonerará a Immucor, las filiales de Immucor, sus gestores, directores, dirigentes, empleados, patrocinadores y agentes (denominados conjuntamente las "Partes Indemnizadas") frente a cualquier o toda responsabilidad, pérdida, daño, reclamación o gasto, incluidos los honorarios de abogados (denominados conjuntamente "Pérdidas de las Partes Indemnizadas") que se deriven de este Acuerdo o que guarden relación con este, incluidas, sin carácter restrictivo, las Pérdidas de las Partes Interesadas resultantes de cualquier uso por parte del Licenciario o en su nombre. El Licenciario indemnizará y exonerará a las Partes Indemnizadas frente a las Pérdidas de las Partes Indemnizadas, ya sea en parte o en su totalidad, que se deriven, resulten o guarden relación con una infracción de este Acuerdo por parte del Licenciario; así como frente a reclamaciones por parte de un tercero porque el Licenciario o el uso de los Reactivos por parte del Licenciario infrinja o se apropie indebidamente de cualquier patente, derecho de autor, marca comercial, secreto comercial o cualquier otro derecho de propiedad intelectual de dicho tercero.
4. Este Acuerdo se aplica exclusivamente a los Reactivos. Todo uso del software Mia Fora está sujeto al Acuerdo de Licencia de Usuario Final correspondiente. Este Acuerdo debe interpretarse e implementarse de acuerdo con las leyes del Estado de Nueva York en Estados Unidos. Si el comprador no desea aceptar los términos de este Acuerdo, Immucor aceptará la devolución del producto.

**Fabricante:** BioArray Solutions Ltd., 35 Technology Drive, Suite 100, Warren, NJ 07059 (E.E. UU.) Teléfono: (908) 226-8200, Fax: (908) 226-0800

**Representante autorizado:** Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Robert-Bosch-Straße 32, 63303 Dreieich, ALEMANIA  
Teléfono: +49 (0) 6103 80560, Fax: +49 (0) 6103 8056199



**Servicio de asistencia técnica en Europa:** Teléfono: +32 (0)3 385 47 91

## MARCAS COMERCIALES UTILIZADAS

MIA FORA y SIRONAQUANT son marcas comerciales de Sirona Genomics, Inc.  
Todas las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios.

Paula Zucchini  
Farmacéutica  
M.N. 12.855

HEMOMEDICA S.R.L.  
GUSTAVO A. REINOSO

Documentación del producto y traducciones disponibles en: [www.immucor.com](http://www.immucor.com)

**PROSPECTO**

MIA FORA™ NGS MFlex HT HLA Typing Kit (kit de tipificación del HLA)  
 Para uso diagnóstico *in vitro*

<b>CONTENIDOS</b>			
Definición de símbolos .....	1	Extracción y preparación de muestras .....	6
Reactivos por número de catálogo.....	2	Procedimiento.....	7
Uso previsto.....	4	A. Materiales suministrados .....	7
Resumen y explicación .....	4	B. Materiales necesarios, pero no suministrados.....	7
Principios del procedimiento .....	4	Instrucciones de uso .....	7
Reactivos.....	5	Control de calidad.....	15
A. Identificación.....	5	Limitación del procedimiento .....	15
B. Advertencias y precauciones .....	5	Características específicas de rendimiento.....	16
C. Instrucciones de almacenamiento.....	6	Solución de problemas .....	17
D. Purificación o tratamiento para su uso ...	6	Limitación de las licencias .....	18
E. Indicaciones de inestabilidad .....	6	Información del fabricante .....	18
Requisitos del instrumento .....	6	Marcas comerciales utilizadas.....	18

**Definición de símbolos**

Código de lote		Número de catálogo		Límite de temperatura	
Fecha de caducidad		Número de serie		Contenido suficiente para <n> ensayos	
Precaución		Consultar instrucciones de uso		Fabricante	
Representante autorizado de la Comunidad Europea		Producto sanitario para diagnóstico in vitro		Contiene	
		Conformité Européene			

Paula Zucchini  
 Farmacéutica  
 M.N. 12.855

HEMOMEDICA S.R.L.  
 GUSTAVO A. FEINOSO  
 Socio Gerente

## REACTIVOS POR NÚMERO DE CATÁLOGO

MIA FORA NGS MFlex HT HLA Typing Kit (kit de tipificación del HLA) con kits de reactivos para 6 u 11 genes.

**MIA FORA NGS MFlex 6 HT HLA Typing Kit (kit de tipificación del HLA), 1152 ensayos, para su uso con la plataforma de secuenciación de nueva generación de Illumina**  
**Catálogo # SR-800-10535-1152**

- a) MIA FORA NGS MFlex 6 HT HLA PCR Kit (kit para la PCR del HLA) (SR-800-00532) con un (1) vial

	Número del producto	Volumen de llenado	Almacenamiento	
P-6 MFlex 6 HT PCR Reagent (reactivo para la PCR)	SR-800-00524	20 ml	De -20 a -80 °C (Almacenamiento a largo plazo: -20 °C en congelador de descongelación manual)	 1152

- b) MIA FORA NGS Library Prep Kit (kit para preparación de bibliotecas), 1152 ensayos (SR-800-00533): con ocho (8) viales y doce (12) placas adaptadoras de índices

	Reactivo	Número del producto	Volumen de llenado	Almacenamiento	
L1	Mezcla enzimática primaria	SR-800-00478	2,1 ml	De -20 a -80 °C (Almacenamiento a largo plazo: -20 °C en congelador de descongelación manual)	 1152
L2	Mezcla de tampón primaria	SR-800-00479	13,3 ml		
L3	Enzima ligasa	SR-800-00487	1,4 ml		
L4	2X Tampón de ligasa Dos (2) por kit	SR-800-00488	17,5 ml		
L5	Mezcla de tampón/enzima para PCR	SR-800-00492	415 µl		
L6	Cebadores de amplificación	SR-800-00490	35 µl		
L7	Agua sin nucleasas	SR-800-00491	300 µl		
1	Placa adaptadora de índices Dos (2) por kit	SR-800-00402-01	10 µl/pocillo		
2	Placa adaptadora de índices Dos (2) por kit	SR-800-00402-02	10 µl/pocillo		
3	Placa adaptadora de índices Dos (2) por kit	SR-800-00402-03	10 µl/pocillo		
4	Placa adaptadora de índices Dos (2) por kit	SR-800-00402-04	10 µl/pocillo		
5	Placa adaptadora de índices Dos (2) por kit	SR-800-00402-05	10 µl/pocillo		
6	Placa adaptadora de índices Dos (2) por kit	SR-800-00402-06	10 µl/pocillo		

- c) MIA FORA NGS HLA Magnetic Beads (bolas magnéticas) (n.º de cat. SR-800-10379-02)

Paula Zucchini  
 Farmacéutica  
 M.N. 12.855

LABORATORIO MEDICAL  
 SUSANA REINOSO  
 Socio Gerente

**MIA FORA NGS MFlex 11 HT HLA Typing Kit (kit de tipificación del HLA), 1152 ensayos, para su uso con la plataforma de secuenciación de nueva generación de Illumina, n.º de catálogo SR-800-10534-1152**

- a) MIA FORA NGS MFlex 11 HT PCR Kit (kit para la PCR) (SR-800-00531) con un (1) vial

	Número del producto	Volumen de llenado	Almacenamiento	
P-11 MFlex 11 HT PCR Reagent (reactivo para la PCR)	SR-800-00521	20 ml	De -20 a -80 °C (Almacenamiento a largo plazo: -20 °C en congelador de descongelación manual)	

- b) MIA FORA NGS Library Prep Kit (kit para preparación de bibliotecas), 1152 ensayos (SR-800-00533) con ocho (8) viales y doce (12) placas adaptadoras de índices

Reactivo		Número del producto	Volumen de llenado	Almacenamiento	
L1	Mezcla enzimática primaria	SR-800-00478	2,1 ml	De -20 a -80 °C (Almacenamiento a largo plazo: -20 °C en congelador de descongelación manual)	
L2	Mezcla de tampón primaria	SR-800-00479	13,3 ml		
L3	Enzima ligasa	SR-800-00487	1,4 ml		
L4	2X Tampón de ligasa Dos (2) por kit	SR-800-00488	17,5 ml		
L5	Mezcla de tampón/enzima para PCR	SR-800-00492	415 µl		
L6	Cebadores de amplificación	SR-800-00490	35 µl		
L7	Agua sin nucleasas	SR-800-00491	300 µl		
1	Placa adaptadora de índices Dos (2) por kit	SR-800-00402-01	10 µl/pocillo		
2	Placa adaptadora de índices Dos (2) por kit	SR-800-00402-02	10 µl/pocillo		
3	Placa adaptadora de índices Dos (2) por kit	SR-800-00402-03	10 µl/pocillo		
4	Placa adaptadora de índices Dos (2) por kit	SR-800-00402-04	10 µl/pocillo		
5	Placa adaptadora de índices Dos (2) por kit	SR-800-00402-05	10 µl/pocillo		
6	Placa adaptadora de índices Dos (2) por kit	SR-800-00402-06	10 µl/pocillo		

- c) MIA FORA NGS HLA Magnetic Beads (bolas magnéticas) (n.º de cat. SR-800-10379-02)

## USO PREVISTO

MFlex6	El kit MIA FORA™ NGS MFlex6 se ha concebido para la amplificación y secuenciación de los genes del HLA: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 y HLA-DPB1 en la plataforma de secuenciación de nueva generación de Illumina. El software MIA FORA se ha diseñado como guía para determinar el tipo de HLA a partir de los datos que se hayan generado con el MIA FORA NGS Library Prep Kit (kit para preparación de bibliotecas). El ensayo se ha concebido para su uso en un laboratorio especializado y experto en la manipulación de ADN para su amplificación y secuenciación. El ensayo se ha concebido para procesarse como un panel de 384 hasta 576 muestras. Los resultados se han validado con el software MIA FORA NGS.
MFlex11	El kit MIA FORA™ NGS MFlex11 se ha concebido para la amplificación y secuenciación de los genes del HLA: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1-1/3/4/5, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DPA1 y HLA-DPB1 en la plataforma de secuenciación de nueva generación de Illumina. El software MIA FORA se ha diseñado como guía para determinar el tipo de HLA a partir de los datos que se hayan generado con el MIA FORA NGS Library Prep Kit (kit para preparación de bibliotecas). El ensayo se ha concebido para su uso en un laboratorio especializado y experto en la manipulación de ADN para su amplificación y secuenciación. El ensayo se ha concebido para procesarse como un panel de 384 hasta 576 muestras. Los resultados se han validado con el software MIA FORA NGS.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La tipificación basada en la secuencia (SBT) de exones amplificados mediante PCR de los genes del HLA es un procedimiento de laboratorio frecuente. La amplificación mediante PCR se utiliza para enriquecer las secuencias diana y posteriormente tipificar el HLA de las regiones seleccionadas. Otros métodos como las sondas de oligonucleótidos específicas de secuencia (SSOP) y los ensayos de extensión de cebadores específicos de secuencia (SSP) también se han utilizado para determinar la tipificación del HLA. El sistema de tipificación del HLA MIA FORA NGS MFlex HT es una metodología de tipificación del HLA nueva que emplea la capacidad para capturar todas las regiones pertinentes de los locus del HLA mediante PCR de gran alcance. En el kit se incluye una mezcla maestra para PCR que contiene todos los componentes necesarios para amplificar cada gen, incluidas enzimas, tampones, dNTP y cebadores para la amplificación mediante PCR de gran alcance. A continuación, el ADN amplificado puede procesarse con el MIA FORA NGS Library Prep Kit (kit para preparación de bibliotecas) con el objeto de generar una biblioteca para secuenciarla en la plataforma de Illumina. El kit se ha validado para la secuenciación mediante multiplexación de 384 hasta 576 muestras con la plataforma Illumina NextSeq.

## PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El MIA FORA NGS MFlex HT HLA Typing Kit (kit de tipificación del HLA) se ha diseñado para tipificar los locus del HLA de clase I y clase II mediante la secuenciación del gen completo o de los exones e intrones con mayor información. El MIA FORA NGS MFlex HT HLA Typing Kit (kit de tipificación del HLA) utiliza la PCR de gran alcance para capturar y enriquecer los genes de clase I HLA-A, -B y -C, y los genes de clase II HLA-DQB1, -DPB1, -DPA1, -DQA1 y -DRB1/3/4/5, que se amplifica como dos segmentos solapados debido a su gran tamaño. En el sistema MIA FORA, se hace referencia a ellos como DRB-S y DRB-L. El MIA FORA NGS Library Prep Kit (kit para preparación de bibliotecas) genera una biblioteca a partir del ADN amplificado para su secuenciación en la plataforma de Illumina. El software MIA FORA proporciona la secuencia de los genes relevantes de HLA así como información de la ordenación para lograr una tipificación del HLA de alta resolución.

Paula Zucchini  
Farmacéutica  
M.N. 12.855

## REACTIVOS

### A. Identificación

Consulte las tablas de la sección Reactivos por número de catálogo para obtener un listado completo de productos y números de catálogos.

### B. Advertencias y precauciones

1. MIA FORA tiene la marca CE para uso diagnóstico in vitro. Los resultados de estos kits no deben emplearse como única base sobre la cual tomar una decisión clínica que afecte al paciente.
2. Los kits deben utilizarse en un periodo de cuatro (4) meses desde su uso inicial y pueden someterse a un máximo de cuatro (4) ciclos de congelación/descongelación. Los kits deben almacenarse congelados a -20 °C.
3. Deben asignarse laboratorios separados o espacios cerrados en el laboratorio para las manipulaciones previas a la PCR, así como para las manipulaciones posteriores a la PCR.
4. Deben emplearse pipetas separadas para las manipulaciones previas a la PCR, así como para las manipulaciones posteriores a la PCR.
5. **Riesgo biológico:** todas las muestras biológicas y sanguíneas deben tratarse como muestras potencialmente infecciosas. **Siga las directrices de precaución universales cuando las manipule.**
6. Nunca pipetee con la boca. Evite el contacto de reactivos o muestras con la piel y membranas mucosas.
7. Deseche los materiales usados de acuerdo con las normativas del centro o locales para la eliminación de materiales potencialmente biopeligrosos.
8. La tecnología de PCR es sensible a la contaminación, especialmente de su propio producto. Los aerosoles de amplicones para PCR que se generan durante los pasos para después de la PCR son una fuente frecuente de contaminación. Se debe tener cuidado de evitar las salpicaduras excesivas y la generación de aerosoles. Durante el uso del equipo, deben seguirse también las medidas habituales de laboratorio para PCR, como limpiar las superficies de trabajo antes del procesamiento o la preparación de las muestras para PCR con lejía al 10 % recién preparada, el uso de luz ultravioleta (UV) en campanas o armarios de seguridad biológica entre los usos, la separación en espacio y tiempo de las actividades previas y posteriores a la PCR, el uso de reactivos de PCR en alícuotas y el uso de controles positivos y negativos, entre otros. El empleo de una técnica coherente y cautelosa garantizará una mínima contaminación de la PCR.
9. Los laboratorios deben validar sus propios procedimientos de limpieza.
10. La contaminación de los reactivos o las muestras puede provocar resultados erróneos. Por lo tanto, tenga cuidado de evitar la contaminación de este producto durante su uso. No utilice reactivos contaminados.
11. Utilice los líquidos del kit como se suministren. Su dilución o alteración puede generar resultados erróneos. No mezcle reactivos de diferentes lotes.
12. No use frascos con fugas o no rotulados.
13. Las muestras o reactivos previamente congelados deben mezclarse bien y centrifugarse posteriormente después de descongelarlos y antes de los ensayos. Evite la generación de espuma y burbujas en las muestras.
14. Mantenga todas las enzimas y las mezclas maestras en hielo o criobloques (de 2 a 8 °C) durante la descongelación.
15. Compruebe el correcto sellado de los tubos de muestras antes de la amplificación para impedir la evaporación.
16. A causa de las diferencias inherentes en los mecanismos del funcionamiento del termociclador, puede producirse una variación en los resultados al transferir perfiles térmicos establecidos entre diferentes marcas y modelos de instrumentos termocicladores. En algunos casos, la especificidad y la sensibilidad de la reacción pueden verse afectadas, lo que puede provocar una interpretación y comunicación falsas de los datos. El usuario debe validar otros termocicladores y perfiles.
17. Unos tiempos de incubación o unas temperaturas distintas a las especificadas pueden dar resultados erróneos.
18. El incumplimiento de las directrices de uso recomendadas puede provocar un rendimiento no óptimo del producto. En función de la naturaleza y gravedad del incumplimiento, pueden producirse un fallo del análisis (muestra individual o fallos de la ejecución) o unos resultados erróneos. Por ejemplo, hemos determinado que la utilización de bolas para limpieza insuficientes/inactivas en el ensayo puede provocar una elevada incidencia de fallos en el adaptador de índices que haga que haya datos insuficientes para la tipificación.
19. Se recomienda que realice una electroforesis en gel para el análisis de los productos de amplificación de genes del HLA por tamaño. Los productos de PCR deben visualizarse con bromuro de etidio o GelRed; otras tinciones pueden mostrar bandas débiles.
20. En algunos pasos del protocolo se utilizan bolas magnéticas. Es importante que retire el etanol antes de proceder al paso de elución sin haber dejado que las bolas se sequen en exceso. La superficie de las bolas magnéticas debe mostrar un aspecto vidrioso sin colecciones visibles de líquido. El tiempo de secado adecuado puede determinarse de manera empírica en cada laboratorio (de 5 a 10 minutos).
21. Utilice etanol recién diluido al 80 % para cada limpieza con bolas.
22. Cuando prepare la placa de ligación al adaptador de índices, utilice unos guantes nuevos para manipular la placa adaptadora. Retire con cuidado el adhesivo de la placa.
23. Los kits NextSeq (de rendimiento medio y rendimiento alto) se han validado para la secuenciación mediante multiplexación de hasta 576 muestras. Como las bibliotecas están preparadas para cada placa adaptadora de índices, el usuario debe validar la cantidad de muestras que se pueden procesar en las demás plataformas de secuenciación de Illumina.
24. Las bibliotecas preparadas con los adaptadores de índices del kit de 24 y 96 ensayos MIA FORA NGS MFLex no se pueden combinar en la misma secuenciación con las bibliotecas preparadas con el kit de 1152 ensayos.

### C. Instrucciones de almacenamiento

1. Almacene el MIA FORA NGS MFlex HT HLA Typing Kit (kit de tipificación del HLA) a -20 °C en un congelador de descongelación manual.
2. No utilice los componentes una vez vencidas sus fechas de caducidad.
3. Almacene las bolas magnéticas a una temperatura entre 2 y 8 °C.

### D. Purificación o tratamiento requerido para su uso

Consulte "Extracción y preparación de muestras"

### E. Indicaciones de inestabilidad

1. Si se han precipitado sales fuera de la solución durante el transporte o almacenamiento, vuelva a solubilizar por completo antes de su uso mediante agitación vorticial a temperatura ambiente (de 18 a 30 °C).

## REQUISITOS DEL INSTRUMENTO

1. Termociclador equipado con tapa calefactada, tiempos de aumento ajustables y un rango térmico mínimo de 2 a 100 °C con una precisión de al menos  $\pm 0,5$  °C. Puede que deban modificarse las condiciones de los termocicladores para optimizar los perfiles. Se ha validado el termociclador Veriti de Applied Biosystems, si se ejecuta en el modo predeterminado con una velocidad de aumento de 3,9 °C/s.<sup>1</sup>
2. Método/aparato apropiado para el aislamiento y la purificación de fragmentos de ADN con un tamaño de aproximadamente 500 a 900 pares de bases. Se ha validado un aparato para la selección de ese tamaño: instrumento Pippin Prep™. También se ha validado un método alternativo para la selección del tamaño utilizando bolas magnéticas.
3. Sistema de manipulación de líquidos opcional para la generación semiautomatizada de bibliotecas. Se ha validado el sistema Biomek FX<sup>®</sup> y Biomek i7.<sup>1</sup>
4. Se ha validado el sistema Qubit como aparato/método adecuado para la cuantificación de bibliotecas.<sup>1</sup>
5. La plataforma de secuenciación Illumina Next Seq se ha validado para entre 384 y 576 muestras.<sup>1</sup>
6. Software y servidor MIA FORA NGS: número de referencia de Immucor SR-850-00062 o SR-850-00068.

<sup>1</sup> Estas metodologías se validaron en Immucor; el usuario deberá revisar sus requisitos específicos y realizar sus propias validaciones.

## EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- El ADN genómico humano puede purificarse a partir de sangre completa, capas plaquetarias e hisopos bucales a través de un método validado que cumpla los criterios que figuran a continuación. El ADN extraído de sangre conservada en EDTA se ha analizado y ha demostrado que ofrece el nivel de rendimiento esperado en este ensayo. El ADN extraído de sangre conservada en heparina no se puede utilizar en este ensayo.
- El ADN aislado debe conservarse en Tris-HCl de 10 mM, con un pH de 8,0 a 9,0, o bien en agua sin nucleasas. Si se emplea un agente quelante como el EDTA, la concentración final del agente quelante no debe superar los 0,5 mM.
- La concentración final de ADN debe ser de 5 a 15 ng/ $\mu$ l para extracciones de sangre completa y capas plaquetarias.
- La concentración final de ADN debe ser de 2 a 8 ng/ $\mu$ l para extracciones de hisopos bucales.
- Las mediciones de absorbancia de la muestra de ADN a 260 y 280 nm deben ofrecer un cociente de 1,65 a 2,0.
- El ADN se puede utilizar inmediatamente después del aislamiento o almacenar a -20 °C durante un periodo de hasta 1 año. Deben evitarse los ciclos repetidos de congelación/descongelación dado que puede degradar el ADN.
- Al menos el 50 % de la muestra de ADN genómico debe estar compuesto de fragmentos superiores a 10 kb para llevar a cabo una amplificación mediante PCR de gran alcance correcta.

Paula Zucchini  
Farmaceutica  
M.N. 12.855

## PROCEDIMIENTO

### A. Materiales suministrados (Consulte la tabla en la sección Reactivos por número de catálogo para obtener información más específica).

- Reactivo para PCR
- Reactivos para la preparación de bibliotecas y la placa adaptadora de índices
- MIA FORA HLA Magnetic Bead Kit (kit de bolas magnéticas) (n.º de cat. SR-800-10379-02)
- Software MIA FORA NGS (Nota: proporcionado durante la instalación inicial del laboratorio)

### B. Materiales, reactivos y equipos necesarios, pero no suministrados

- Termocicladores: se ha validado ABI Veriti®.
- Gradillas magnéticas para eluciones de bajo volumen en placas de 96 pocillos: se ha validado Alpaqua Magnum FLX.
- Gradilla magnética para separación magnética de tubos de microcentrífuga: se ha validado el imán DynaMag-2.
- Microcentrífuga de tubos y centrífuga de placas de sobremesa.
- Pipetas, pipetas multicanal y puntas (1-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl).
- Adhesivos para sellado de placas de PCR: se ha validado el film adhesivo para PCR Accuseal (Thomas Scientific, n.º de cat. T796150; 4titude, n.º de cat. 4ti-0500).
- Tubos en tiras de PCR y tubos para centrífuga de 1,5 ml.
- Mezcladora vorticial.
- Placas de 96 pocillos con semifaldilla y cubierta dura FrameStar® (Thomas Scientific, n.º de cat. EK-75012; 4titude, n.º de cat. 4ti-0770/C).
- Reservorios para reactivos.
- Almohadillas de cinta de sellado transparentes.
- Papel para lentes.
- Puntas de pipetas desechables con filtro (resistentes a aerosoles) que cubren la gama de 0,1 µl a 1000 µl.
- Etanol 200 probado para biología molecular.
- Tris-HCl de 10 mM y pH 8,0.
- Tween 20 al 100 %.
- Hidróxido de sodio, 1 N.
- Agua sin nucleasas.
- Agarosa al 1,5 %, libre de tinciones, patrones internos, Pippin Prep™, de 250 pb a 1,5 kb (Sage Science, CDF1510).
- Control PhiX, v. 3 (Illumina n.º de cat. FC-110-3001).
- Al menos uno de los siguientes kits: para secuenciarlo en Illumina Next Seq.
  - NextSeq® 500/550 Mid Output Kit v2 (kit de rendimiento medio), 300 ciclos (Illumina, n.º de cat. FC-404-2003)
  - NextSeq® 500/550 High Output Kit v2 (kit de rendimiento alto), 300 ciclos (Illumina, n.º de cat. FC-404-2004)
- Aparato/kit/método de cuantificación de bibliotecas preciso: se ha validado el fluorómetro Qubit.

## INSTRUCCIONES DE USO

El ensayo puede llevarse a cabo para entre 384 y 576 muestras siguiendo el protocolo manual que se describe a continuación. También hay disponible un protocolo de automatización detallado para los kits MFlex con los instrumentos Biomek FX<sup>P</sup> o Biomek i7 a través del representante de ventas técnico de Immucor. Los usuarios deberán llevar a cabo sus propias validaciones si utilizan otros sistemas de manipulación de líquidos automatizados.

### NOTAS:

- Extreme las precauciones en el proceso de pipeteado. Utilice pipetas calibradas. En caso contrario, podría perderse reactivo y producirse un fallo en el ensayo.
- Todas las temperaturas deben mantenerse de manera precisa.
- Deje que las bolas magnéticas alcancen la temperatura ambiente antes de su uso.
- El producto amplificado puede almacenarse hasta 4 días a -20 °C antes de su uso. El producto amplificado puede congelarse y descongelarse una vez. Unos ciclos repetidos de congelación/descongelación pueden derivar en la degradación del producto amplificado y ofrecer unos resultados deficientes si se utiliza para generar bibliotecas.

### A. Purificación de ADN genómico

Purifique el ADN genómico con el método de su elección. Los requisitos para las muestras de ADN son los que figuran a continuación:

- Las muestras de ADN genómico deben extraerse de la sangre completa o el hisopo bucal con un método de extracción de ADN que pueda generar un ADN de alto peso molecular.
- El ADN debe diluirse en agua sin nucleasas y almacenarse a -20 °C o a una temperatura inferior.
- La concentración final de ADN debe ser de 5 a 15 ng/µl para extracciones de sangre completa y de 2 a 8 ng/µl para extracciones de hisopos bucales, además de mantenerse a niveles de concentración similares en todas las muestras. Si es necesario, ajuste con agua sin nucleasas.
- Al menos el 50 % de cada muestra de ADN genómico debe estar compuesto de fragmentos superiores a 10 kb y el cociente OD 260/280 debe encontrarse entre 1,65 y 2,0 para llevar a cabo una PCR de gran alcance correcta.

### B. Amplificación de ADN (PCR)

Las muestras de ADN genómico humano (hgADN) dirigidas a genes HLA se amplifican a través de PCR de gran alcance con el fin de prepararse para la secuenciación de Illumina. Las muestras de hgADN se organizan en columnas en placas de 96 pocillos y posteriormente se distribuyen a las placas de PCR, donde se combinarán con una mezcla maestra de PCR completa que contiene cebadores únicos para cada gen, dNTP, tampón de PCR y enzima. La amplificación se completa en placas de PCR con semifaldilla y cubierta dura de 96 pocillos.

### Preparación para PCR para muestras de ADN de sangre completa

1. Cree un archivo con códigos de barras de muestras utilizando el formato de valores separados por comas de Windows (.csv) con los nombres de muestras y las asignaciones de códigos de barras que se muestran en la **figura 1**. Incluya el nombre del proyecto y la posición del pocillo de cada muestra. Utilice el archivo con códigos de barras de muestras para crear un nuevo proyecto en el software MIA FORA NGS (consulte el manual del software MIA FORA NGS para obtener instrucciones detalladas). El nombre del proyecto generado se puede usar para poner nombres coherentes a las placas.

NOTA: los adaptadores de índices a partir de placas adaptadoras de índices con nombres idénticos (1-6) no se pueden combinar en la misma biblioteca. Los adaptadores de índices entre kits no se pueden intercambiar.

Placa adaptadora SR-800-00402-03

1	Muestra	ID de código de barras
2	NTC	Plate03_A01
3	Sample1	Plate03_B01
4	Sample2	Plate03_C01
5	Sample3	Plate03_D01
6	Sample4	Plate03_E01
7	Sample5	Plate03_F01
8	Sample6	Plate03_G01
9	Sample7	Plate03_H01
10	Sample8	Plate03_A02
11	Sample9	Plate03_B02
12	Sample10	Plate03_C02
13	Sample11	Plate03_D02
14	Sample12	Plate03_E02
15	Sample13	Plate03_F02
16	Sample14	Plate03_G02
17	Sample15	Plate03_H02
18	Sample16	Plate03_A03
19	Sample17	Plate03_B03
20	Sample18	Plate03_C03
21	Sample19	Plate03_D03
22	Sample20	Plate03_E03
23	Sample21	Plate03_F03
24	Sample22	Plate03_G03
25	Sample23	Plate03_H03

Figura 1: Ejemplo de formato de archivo de códigos de barras de muestras

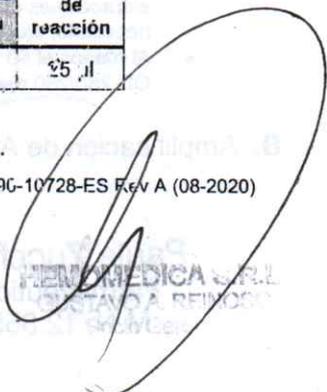
**Nota:** la columna de ID de código de barras debe corresponder a los últimos 2 dígitos de la placa adaptadora de índices. (es decir, Plate03\_A01 coincide con el pocillo A01 de la placa adaptadora SR-800-00402-03).

2. Genere un proyecto en el software MIA FORA NGS después de crear un archivo con códigos de barras de muestras que contenga los nombres de las muestras y los códigos de barras. El nombre del proyecto es necesario para el nombre de la secuenciación.
3. En función del número total de muestras, etiqueta la cantidad correspondiente de placas de PCR con semifaldilla y cubierta dura.
4. Programe termocicladores con el programa de amplificación de la **tabla 1** y póngale el nombre MIA\_FORA\_MFlex\_PCR\_WholeBloodDNA a este último. Utilice el ajuste de tapa calefactada.
5. Mediante placas de 96 pocillos con semifaldilla y cubierta dura, prepare placas de muestras de ADN con 15 µl de muestra de hgADN por pocillo a una concentración de 5 a 15 ng/µl. El pocillo A1 debería ser de Tris-HCl de 10 mM con un pH de 8,0 de control sin cadena molde (NTC).

Tabla 1: Programa de amplificación para PCR de gran alcance: MIA\_FORA\_MFlex\_PCR\_WholeBloodDNA

Ciclo (1)	Ciclos (20)			Ciclo (1)	Volumen de reacción
Reacción inicial	Desnaturalización	Anneación	Extensión	Ext. final	
98 °C/10 s	98 °C/30 s	60 °C/15 s	66 °C/10 s	36 °C/10 m	4 °C/∞

6. Centrifugue brevemente la placa de muestras para llevar esas últimas al fondo de los pocillos.



7. Descongele la mezcla maestra para PCR. Mezcle por inversión o brevemente mediante agitación vorticial y centrifugue el tubo.
8. Dispense 15 µl de mezcla maestra de PCR en cada ubicación de pocillo de reacción designada en cada placa de PCR con semifaldilla, cubierta dura y etiquetada. (**Importante: dispense la mezcla maestra con cuidado para minimizar la introducción de burbujas**).
9. Dispense 10 µl de muestras de ADN de las placas de muestras en los pocillos de reacción correspondientes que contengan la mezcla maestra de PCR con una pipeta multicanal. El volumen total de la reacción de PCR es ahora de 25 µl (**importante: no mezcle durante la adición de ADN ni después de esta**).
10. Selle las placas de PCR con la película adhesiva para PCR Accuseal.
11. Centrifugue brevemente cada placa de PCR para asegurarse de que todos los líquidos se centrifuguen hasta el fondo de los pocillos.
12. Coloque cada placa en un termociclador y ejecute el programa MIA\_FORA\_MFlex\_PCR\_WholeBloodDNA que se muestra en la **tabla 1**.
13. **Opcional:** realice una electroforesis en gel para el análisis de los productos de amplificación por tamaño. **Nota:** el bromuro de etidio es el colorante de gel de ácido nucleico fluorescente preferido.

**Nota:** cuando se procesa el ADN de sangre completa y de hisopo bucal en la misma placa de reacción, se debe utilizar el programa de amplificación para PCR de gran alcance para ADN bucal.

**PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO:** los productos de PCR se pueden almacenar a -20 °C hasta 4 días.

### Preparación para PCR para muestras de ADN de hisopos bucales

Nota: siga el mismo protocolo que para las muestras de ADN de sangre completa con los siguientes cambios:

1. Programe un termociclador con el programa de amplificación de la **tabla 2** y póngale el nombre MIA\_FORA\_MFlex\_PCR\_BuccalDNA a este último. Utilice el ajuste de tapa calefactada.

**Tabla 2: Programa de amplificación para PCR de gran alcance: MIA\_FORA\_MFlex\_PCR\_BuccalDNA**

Ciclo (1)	Ciclos (25)			Ciclo (1)		Volumen de reacción
Retención inicial	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Ext. final	Retención	
98 °C/10 s	98 °C/30 s	60 °C/15 s	66 °C/10 m	25 µl	4 °C/∞	25 µl

2. Con una placa de 96 pocillos con semifaldilla y cubierta dura, prepare una placa de muestras de ADN con 15 µl de muestra de hgADN por pocillo a una concentración de 2 a 8 ng/µl. El pocillo A1 debería ser de Tris-HCl de 10 mM con un pH de 8,0 de control sin cadena molde (NTC).

**Nota:** cuando se procesan el ADN de sangre completa y de hisopo bucal en la misma placa de reacción, se debe utilizar el programa de amplificación para PCR de gran alcance para ADN bucal.

**PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO:** los productos de PCR se pueden almacenar a -20 °C hasta 4 días.

### C. Generación de bibliotecas de secuenciación

Los productos de PCR se unen enzimáticamente en fragmentos, se reparan los extremos y se realiza su poliadenilación en el extremo 3' de modo que los fragmentos puedan ligarse al saliente 5'-T de cada adaptador de índices. Los fragmentos poliadenilados se limpian después con bolas magnéticas antes de la ligación al adaptador de índices. Los fragmentos ligados se agrupan en un único tubo para microcentrifuga y se limpian antes de la selección de los fragmentos de ADN con un rango de tamaño de 500 a 900 pares de bases. Después, los fragmentos seleccionados por tamaño se amplifican, limpian, cuantifican y preparan para la secuenciación de Illumina.

#### a. Preparación de biblioteca primaria: fragmentación, reparación de extremos y poliadenilación

1. Prepare la mezcla maestra transfiriendo la mezcla enzimática principal (tubo L1) y la mezcla de tampón principal (tubo L2) a un tubo para microcentrifuga según la **tabla 3**. Mezcle bien agitando vorticialmente y centrifugue un corto periodo de tiempo.
2. Para cada placa de **96 muestras**, pipetee 150 µl de mezcla maestra de preparación primaria en cada pocillo de una tira de tubos para PCR de 0,2 ml a fin de usarlo como reservorio.
3. Transfiera 11 µl de mezcla maestra del reservorio de la tira de tubos para PCR de 0,2 ml a las columnas 1-12 de la placa de preparación primaria.
4. Añada 14 µl de muestras amplificadas mediante PCR a la placa de preparación primaria. Mezcle aspirando y dispensando con una pipeta hasta 5 veces.

5. Selle la placa de preparación principal con la película adhesiva para PCR Accuseal. Centrifugue bien (por ejemplo: a 2250 rpm durante 1 minuto).
6. Transfiera la placa de preparación primaria a un termociclador y ejecute el programa MIA\_FORA\_MFlex\_PrimaryPrep que se muestra en la **tabla 4**.

**Tabla 3: Preparación de mezcla maestra para preparación primaria**

Tubo	Componente	Volumen por reacción (µl)
L1	Mezcla enzimática primaria	1,5
L2	Mezcla de tampón primaria	9,5

**Tabla 4: Programa de termociclado para preparación primaria de bibliotecas**

MIA FORA MFlex_PrimaryPrep	Total
20 °C durante 10 minutos	25 µl
75 °C durante 30 minutos	
4 °C ∞ en retención	

**PROCEDA INMEDIATAMENTE AL PASO DE LIMPIEZA CON BOLAS**

7. Agite suavemente el frasco de bolas magnéticas a temperatura ambiente o dele vueltas con cuidado para homogeneizar la solución.
8. Para **96 muestras**, pipete 160 µl de bolas magnéticas en dos tiras de tubos para PCR de 0,2 ml (utilice la primera tira de tubos para las columnas 1-6 y la segunda para las columnas 7-12).
9. Añada 20 µl de bolas magnéticas a cada pocillo de la placa de preparación principal y mezcle lentamente succionando y dispensando con una pipeta hasta 10 veces.
10. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
11. Transfiera la placa a la placa magnética Magnum FLX para unir las bolas a los lados de los pocillos.
12. Deje la placa sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
13. Mientras esté sobre el imán, aspire el sobrenadante con una pipeta multicanal sin alterar las bolas y deseche el sobrenadante.
14. Deje la placa en el imán para los pasos de lavado con etanol.
  - a. Lave las bolas añadiendo 200 µl de etanol al 80 % a cada pocillo.
  - b. Incube durante 30 segundos en el imán.
  - c. Retire el etanol con una pipeta multicanal sin alterar las bolas.
15. Repita el lavado con etanol 2 veces más hasta un total de 3 lavados.
16. Elimine el exceso de líquido de los pocillos.
17. Quite la placa del imán y deje que se seque al aire para evaporar el exceso de etanol hasta que las bolas adquieran un aspecto vidrioso (~3 minutos).
18. Asegúrese de que la placa esté fuera del imán y añada 25 µl de Tris-HCl de 10 mM con un pH de 8,0 a las bolas.
19. Mezcle pipeteando un mínimo de 10 veces.
20. Incube fuera del imán durante 5 minutos.
21. Coloque la placa sobre el imán e incube durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
22. Deje la placa en el imán y transfiera 23 µl de eluido sin alterar las bolas a la nueva placa con la etiqueta Proyecto\_LimpiezaPreparaciónPrincipal\_Fecha.

**PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO:** los fragmentos polinucleotídicos, con los extremos reparados, se pueden almacenar a -20 °C durante un máximo de 4 días.

**b. Ligación al adaptador de índices**

1. Vuelva a etiquetar la placa llamada *Preparación\_Limpieza\_Fecha* como Proyecto\_Ligación\_Fecha.
2. Programe un termociclador con las condiciones que se muestran en la **tabla 5**.
3. Descongele y centrifugue bien la placa adaptadora, por ejemplo, a 2250 rpm durante 1 minuto (importante: utilice unos guantes nuevos mientras manipula la placa adaptadora). Verifique visualmente que todos los pocillos de la placa adaptadora contengan unos 10 µl de solución. Retire con cuidado el adhesivo de la placa.  
**Nota:** el kit contiene doce (12) placas adaptadoras de índices con 30 códigos de barras cada una. Los adaptadores de índices a partir de placas adaptadoras de índices con nombres idénticos (1-6) no se pueden combinar en la misma biblioteca.
4. Prepare la mezcla maestra de ligación. El volumen necesario por reacción se muestra en la **tabla 6**. Mezcle bien agitando vorticialmente y centrifugue un corto periodo de tiempo.
5. Transfiera 26 µl de mezcla maestra desde la primera tira de tubos para PCR a cada pocillo de la placa de ligación. Mezcle aspirando y dispensando con una pipeta hasta 5 veces.

- Transfiera 8 µl/pocillo de las columnas adaptadoras apropiadas a los pocillos correspondientes de la placa de ligación. Mezcle aspirando y dispensando con una pipeta hasta 5 veces después de cada adición (**importante: vuelva a sellar los adaptadores no utilizados y congélelos inmediatamente en posición vertical**).
- Selle la placa de ligación con la película adhesiva para PCR Accuseal. Centrifugue bien (por ejemplo: a 2250 rpm durante 1 minuto).
- Transfiera la placa de ligación a un termociclador y ejecute el programa MIA\_FORA\_MFlex\_Ligation que se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5: Programa de termociclado para ligación al adaptador**

MIA_FORA_MFlex_Ligation	Volumen de reacción
25 °C durante 30 minutos	57 µl
65 °C durante 10 minutos	
4 °C ∞ en retención	

**Tabla 6: Preparación de componentes y mezcla maestra para ligación al adaptador**

Tubo	Componente	Volumen por reacción (µl)
L3	Enzima ligasa	1
L4	2X Tampón de ligasa	25
Placa adaptadora	Adaptadores de índices	8

**c. Consolidación de los productos ligados al adaptador y selección de tamaño**

- Combine 6 µl de cada pocillo de la placa Project\_Ligation\_Date en un solo tubo de microcentrifuga de 2,0 ml con la etiqueta "Proyecto-Fecha-Consolidado".  
**NOTA:** por ahora, cada placa de ligación de 96 pocillos se agrupa en un tubo de microcentrifuga independiente de 2,0 ml.
- Tras la agrupación, compruebe visualmente la placa original para confirmar que se han incluido todas las muestras.
- Pipetee 345 µl de bolas magnéticas en cada tubo de muestra consolidado (el volumen de la bola debe ser 0,6x del volumen de la muestra).
- Mezcle bien pipeteando 10 veces.
- Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Transfiera el tubo para microcentrifuga a un imán DynaMag-2 y deje el tubo sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
- Retire y deseche el sobrenadante sin alterar las bolas.
- Deje la placa en el imán para los pasos de lavado con etanol.
  - Lave las bolas añadiendo 1 ml de etanol al 80 % al tubo.
  - Incube durante 30 segundos en el imán.
  - Retire el etanol con una pipeta multicanal sin alterar las bolas.
- Repita el lavado con etanol 2 veces más hasta un total de 3 lavados.
- Quite el exceso de etanol del tubo y deje que se seque al aire para evaporar dicho exceso hasta que las bolas adquieran un aspecto vidrioso (~5 minutos).
- Retire el tubo del imán, vuelva a suspender las bolas en 63 µl de Tris-HCl de 10 mM con un pH de 8,0 y mezcle con una pipeta 10 veces.
- Incube durante 5 minutos.
- Coloque el tubo sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
- Deje el tubo en el imán y transfiera 60 µl de eluido sin alterar las bolas a un nuevo tubo para microcentrifuga etiquetado (ya sea con la etiqueta Proyecto\_LimpiezaConsolidada\_Fecha si utiliza la selección de tamaño con Pippin o Proyecto\_SelecciónTamañoSegúnBolas\_Fecha si emplea la selección de tamaño basada en bolas).

**PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO:** las muestras limpias, consolidadas y ligadas al adaptador (biblioteca) pueden almacenarse a -20 °C durante un máximo de 4 días.

Si va a realizar la selección de tamaño con Pippin, continúe con el apartado **Selección de tamaño (Pippin Prep)** que figura más adelante. Si va a efectuar la selección de tamaño con bolas, prosiga con el apartado **Selección de tamaño (limpieza con bolas 0,8x)** siguiente.

**Selección de tamaño (limpieza con bolas 0,8x)**

- Pipetee 48 µl de bolas magnéticas en el tubo con la etiqueta Proyecto\_SelecciónTamañoSegúnBolas\_Fecha.

2. Mezcle con una pipeta 10 veces e incube durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Transfiera el tubo para microcentrífuga a un imán DynaMag-2 y deje el tubo sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
4. Retire y deseche el sobrenadante sin alterar las bolas.
5. Deje el tubo en el imán para los pasos de lavado con etanol.
  - a. Lave las bolas añadiendo 1 ml de etanol al 80 % al tubo.
  - b. Incube durante 30 segundos en el imán.
  - c. Retire el etanol con una pipeta multicanal sin alterar las bolas.
6. Repita el lavado con etanol 2 veces más hasta un total de 3 lavados.
7. Quite el exceso de etanol del tubo y deje que se seque al aire para evaporar dicho exceso hasta que las bolas adquieran un aspecto vidrioso.
8. Retire el tubo del imán, vuelva a suspender las bolas en 63 µl de Tris-HCl de 10 mM con un pH de 8,0 y mezcle con una pipeta 10 veces.
9. Incube durante 5 minutos.
10. Coloque el tubo sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
11. Deje el tubo en el imán y transfiera 60 µl de eluido sin alterar las bolas a un nuevo tubo para microcentrífuga con la etiqueta Proyecto\_LimpiezaConsolidación\_Fecha.

### **Selección de tamaño (Pippin Prep)**

1. La muestra se purifica mediante el sistema Pippin Prep, que selecciona fragmentos de ADN con el rango de tamaño deseado (500-900 pares de bases). Consulte el manual de instrucciones de Pippin Prep (guía rápida para el casete de gel de agarosa al 1,5 %) para obtener más indicaciones. La duración del procesamiento del protocolo es de aproximadamente 45 minutos.
2. Lleve el tampón de electroforesis Pippin y la mezcla de marcadores a temperatura ambiente.
3. Calibre el sistema Pippin Prep.
4. Abra la bolsa del casete e inspeccione este último. Elimine las burbujas que fluyen libremente cerca de las cámaras de elución dando pequeños golpecitos en el extremo del casete.
5. Quite las tiras adhesivas y compruebe los niveles de tampón en los pocillos de muestras. Los pocillos de muestras deben estar completamente llenos de tampón. Añada tampón si es necesario.
6. Retire todo el líquido de cada cámara de elución con una pipeta de punta estrecha y sustitúyalo por 40 µl de tampón de electroforesis nuevo.
7. Coloque el casete en el instrumento Pippin Prep y cierre la puerta.
8. Seleccione "Test" (Ensayo) para comprobar si los niveles actuales son aceptables.
9. Si el casete supera la comprobación, quítelo del instrumento y proceda al paso 10. Si alguno de los carriles falla, repita los pasos del 5 al 8.
10. Selle las cámaras de elución con la tira adhesiva suministrada. Presione firmemente las cámaras de elución para asegurarse de que el sellado sea hermético.
11. Mezcle 30 µl de la biblioteca limpia y agrupada con 10 µl de la mezcla de marcadores del sistema Pippin Prep.
12. Vuelva a comprobar los niveles de tampón en los pocillos de muestras (añada más si es necesario). El volumen total del pocillo de muestras es de ~70 µl.
13. Etiquete los pocillos del casete con el nombre de la biblioteca y la fecha del procesamiento.
14. Retire y deseche 40 µl de tampón de los pocillos de muestras que se van a utilizar y sustitúyalos por 40 µl de la muestra preparada en el paso 11.
15. Prepare el protocolo del instrumento Pippin seleccionando la pestaña "Protocol Editor" (Editor de protocolo) y proceda de la siguiente manera:
  - Elija "Range" (Rango) para los carriles de muestras.
  - Introduzca un rango de 500 a 900 pares de bases.
  - Añada los nombres de las muestras.

**IMPORTANTE:** seleccione "Off" (Desactivado) en los carriles que no se utilicen.

- Asegúrese de que los valores de "Ref Lane" (Carril de referencia) coincidan con los números de los carriles.
  - Guarde el protocolo como "HLA 500-900". Este protocolo puede utilizarse para futuros procesados.
  - Cierre la puerta del instrumento y seleccione "START" (INICIAR).
  - Aparecerán luces verdes junto a los carriles para indicar el comienzo de la electroforesis.
16. Después de aproximadamente 45 minutos, la barra de progreso se detendrá y el botón "STOP" (DETENER) se verá atenuado, lo que señala que ha finalizado la elución.
  17. Retire la cinta adhesiva de la cámara de elución y transfiera la biblioteca (un total de aproximadamente 40 µl) a un tubo para microcentrífuga limpio con la etiqueta Proyecto\_TrasPippin\_Fecha.
  18. Deseche el casete si se han usado todos los carriles. Si hay carriles que no se hayan utilizado, selle toda la parte superior del casete con cinta adhesiva, envuélvalo en su embalaje original y guárdelo a temperatura ambiente para su posible uso en el futuro.
  19. Deje la puerta del instrumento abierta.
- Nota:** consulte las actualizaciones del software y la guía de usuario proporcionadas por Sage Sciences para conocer el protocolo más reciente.

### **d. Amplificación de biblioteca seleccionada por tamaño**

1. El eluido seleccionado por tamaño se amplifica con los cebadores de Illumina que contienen las secuencias necesarias para la generación de grupos. Se proporcionan componentes suficientes para la preparación de 12 amplificaciones de bibliotecas.
2. Descongele los reactivos en hielo y ensamble los componentes que figuran en la **tabla 7** en un tubo para PCR de 0,2 ml.
3. Asegúrese de que el tubo esté bien sellado y centrifugue brevemente.
4. Transfiera el tubo para amplificación a un termociclador y ejecute el programa MIA\_FORA\_Library\_PCR que se muestra en la **tabla 8**.

**Tabla 7: Componentes para amplificación**

Tubo	Componente	Volumen por reacción (µl)
L5	Mezcla de tampón/enzima para PCR	25
L6	Cebador de amplificación F 25 µM Cebador de amplificación R 25 µM	1
L7	Agua sin nucleasas	9
	Biblioteca seleccionada por tamaño	15

**Tabla 8: MIA FORA MFlex\_Library\_PCR**

Ciclo (1)	Ciclos (12)			Ciclo (1)		Volumen de reacción
Retención inicial	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Ext. final	Retención	
98 °C/30 s	98 °C/15 s	65 °C/30 s	72 °C/30 s	72 °C/5 m	4 °C/∞	50 µl

#### e. Preparación para secuenciación

**NOTA:** este paso posterior a la amplificación debe realizarse en una sala de secuenciación o en una zona separada de la preparación de bibliotecas, preferiblemente en una caja para PCR AirClean para evitar la contaminación de ADN ligado al adaptador de índices con productos finales que contienen las secuencias de grupos de Illumina.

**Limpieza con bolas de ADN después de la amplificación (0,7x para la selección de tamaño con Pippin y 0,3x [limpieza de sobrenadantes]/0,5x para la selección de tamaño basada en bolas)**

1. Transfiera 50 µl de la biblioteca amplificada a un tubo para microcentrífuga.

**Si se utilizó el sistema Pippin:**

2. Pipetee 35 µl de bolas magnéticas (0,7x) y mezcle con una pipeta 10 veces.
3. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Transfiera el tubo para microcentrífuga a un imán DynaMag-2 y deje el tubo sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
5. Retire y deseche el sobrenadante sin alterar las bolas.
6. Deje la placa en el imán para los pasos de lavado con etanol.
  - a. Lave las bolas añadiendo 200 µl de etanol al 80 % al tubo o un volumen suficiente para cubrir las.
  - b. Incube durante 30 segundos en el imán.
  - c. Retire el etanol con una pipeta multicanal sin alterar las bolas.
7. Repita el lavado con etanol 2 veces más hasta un total de 3 lavados.
8. Quite el exceso de etanol del tubo y deje que se seque al aire para evaporar dicho exceso hasta que las bolas adquieran un aspecto vídrioso (~3 minutos).
9. Retire el tubo del imán, vuelva a suspender las bolas en 20 µl de Tris-HCl de 10 mM con un pH de 8,0 y mezcle con una pipeta 10 veces.
10. Incube durante 5 minutos.
11. Coloque el tubo sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
12. Deje el tubo en el imán y transfiera 18 µl de eluido sin alterar las bolas a un nuevo tubo para microcentrífuga con la etiqueta Proyecto\_LimpiezaBiblioteca\_Fecha.

**Si se utiliza la selección de tamaño basada en bolas:**

2. Pipetee 15 µl de bolas magnéticas (0,3x) y mezcle con una pipeta 10 veces.

Paula Zucchini  
Farmacéutica  
M.N. 12.855

3. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Transfiera el tubo para microcentrifuga a un imán DynaMag-2 y deje el tubo sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
5. **Retire 50 µl del sobrenadante sin alterar las bolas y transfíralos a otro tubo para microcentrifuga limpio. NO DESECHE EL SOBRENADANTE.**
6. Añada 25 µl (0,5x) de bolas magnéticas al sobrenadante y mezcle con una pipeta 10 veces.
7. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
8. Transfiera el tubo para microcentrifuga a un imán DynaMag-2 y deje el tubo sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
9. Retire y deseche el sobrenadante sin alterar las bolas.
10. Deje la placa en el imán para los pasos de lavado con etanol.
  - a. Lave las bolas añadiendo 200 µl de etanol al 80 % al tubo o un volumen suficiente para cubrir las bolas.
  - b. Incube durante 30 segundos en el imán.
  - c. Retire el etanol con una pipeta multicanal sin alterar las bolas.
11. Repita el lavado con etanol 2 veces más hasta un total de 3 lavados.
12. Quite el exceso de etanol del tubo y deje que se seque al aire para evaporar dicho exceso hasta que las bolas adquieran un aspecto vidrioso (~3 minutos).
13. Retire el tubo del imán, vuelva a suspender las bolas en 20 µl de Tris-HCl de 10 mM con un pH de 8,0 y mezcle con una pipeta 10 veces.
14. Incube durante 5 minutos.
15. Coloque el tubo sobre el imán durante 3 minutos o hasta que la solución se aclare.
16. Deje el tubo en el imán y transfiera 18 µl de eluido sin alterar las bolas a un nuevo tubo para microcentrifuga con la etiqueta Proyecto\_LimpiezaBiblioteca\_Fecha.

**PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO:** las muestras eluidas se pueden almacenar a -20 °C hasta 4 días.

**Quantificación de productos de PCR mediante el sistema Qubit.**

1. Asegúrese de que todos los reactivos del análisis estén a temperatura ambiente antes de iniciar el procedimiento.
2. Prepare el análisis según la guía rápida del sistema Qubit.
3. Calcule la concentración inicial de la biblioteca de secuenciación e introduzca el valor en la tabla 9.

**Tabla 9: Cálculo de la concentración de la biblioteca**

Biblioteca	Concentración inicial (nM)	Volumen de muestra para biblioteca de secuenciación de 4 nM (µl)	Volumen de Tris-HCl de 10 mM con un pH de 8,0 para biblioteca de secuenciación de 4 nM (µl)	Volumen de muestra de 4 nM para la biblioteca de secuenciación combinada de 20 pM (µl)	Volumen de Tris-HCl de 10 mM con un pH de 8,0 para biblioteca de secuenciación de 20 pM (µl)	Concentración final deseada para NextSeq (pM)	Volumen de biblioteca de secuenciación desnaturalizada de 20 pM para 1300 µl de 1,5 µM (µl)	Volumen de HT1 que añadir (µl)
Ejemplo	130	5,0	157,5	5	15	1,5	96	1204
Biblioteca del usuario						1,5	96	1204

**Nota:** debido a la naturaleza de los kits de Illumina, la concentración de las bibliotecas de secuenciación debe ser preferiblemente superior a 10 nM

**Determinación de los métodos de distribución de tamaño de la biblioteca (opcional)**

1. La distribución de tamaño de la biblioteca puede determinarse mediante electroforesis en gel de agarosa o cualquier sistema de electroforesis capilar (por ejemplo, el kit de ADN 1000 Agilent en el bicanalizador Agilent 2100).

**Preparación y carga de la muestra en los secuenciadores de Illumina**

1. Utilice NextSeq® 500/550 Mid Output Kit v2 (kit de rendimiento medio), 300 ciclos (Illumina, n.º cat. FC-404-2003) o NextSeq® 500/550 High Output Kit v2 (kit de rendimiento alto), 300 ciclos (Illumina, n.º cat. FC-404-2004).
2. Verifique que el secuenciador disponga de al menos 400 Gb de espacio libre en la Unidad D/Drive. Si no es así, elimine o transfiera archivos para obtener más espacio.
3. Genere el nombre del proyecto de secuenciación con el software MIA FORA v3.3 iniciando un nuevo proyecto con el archivo CSV con códigos de barras de muestras (figura 7). Use este nombre para preparar un procesamiento en Illumina Experiment Manager.

**f. Análisis de datos**

Los archivos bcl/fastq generados por el instrumento de secuenciación deben analizarse con el software MIA FORA para generar la tipificación del HLA. La hoja de muestras con los nombres de muestras y los códigos de barras, así como los archivos bcl/fastq correspondientes, deben cargarse en el archivo de proyecto del software MIA FORA. Para obtener información sobre el uso del software MIA FORA, siga la guía del usuario del software.

**RESULTADOS**

1. Amplificación mediante PCR:  
El análisis del gel de agarosa no debe mostrar ningún producto en el control negativo (-) para que el análisis se considere válido.

Paula Zucchini  
Farmacéutica  
M.N. 12.855

HILCOMEDICA S.R.L.  
GUSTAVO A. REINOSO  
Socio Gerente

## 2. Preparación de bibliotecas:

La concentración final de la biblioteca debe ser al menos de 10 nM y debe estar cuantificada de manera precisa antes de la secuenciación. Las bibliotecas deben diluirse hasta 4 nM antes de la desnaturalización.

*Debe tener cuidado para cuantificar de manera precisa la biblioteca. Todos los productos posteriores a la ligación al adaptador deben mantenerse bajo una campana para PCR o en un área designada para tal fin, y deben prepararse nuevos reactivos de dilución para evitar cualquier contaminación.*

## 3. La tipificación del HLA genera el software MIA FORA NGS y se proporciona en un informe. Siga la Guía del usuario del software MIA FORA para obtener información sobre el análisis de los datos de tipificación del HLA.

## CONTROL DE CALIDAD

Es necesario procesar un control negativo y un control conocido opcional con cada ensayo, como un blanco de agua y una muestra tipificada con anterioridad, respectivamente. Extremar la precaución cuando retire los sellos de las placas, las cuales deben centrifugarse antes de su apertura. En cada paso debe utilizar sellos para placas nuevos, en los casos en que estas deban sellarse. Las puntas de pipeta utilizadas deben colocarse en los recipientes correspondientes y desecharse. La disposición para PCR debe realizarse en una sala para pasos previos a la PCR separada del lugar donde se manipulan los productos amplificados. Todo el ADN genómico debe diluirse en agua sin nucleasas. Después de la amplificación y la selección de tamaño de ADN, la biblioteca amplificada debe manipularse en una zona separada, preferiblemente una campana para PCR, y manipularse con un conjunto separado de pipetas. Debe tener cuidado de no contaminar las zonas de trabajo con bibliotecas amplificadas. El ensayo debe procesarse según las recomendaciones de este prospecto, así como llevarse a cabo con otros procedimientos de control de calidad conformes a los requisitos de los organismos locales, estatales, federales o de acreditación.

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Se recomienda encarecidamente que estos kits se validen en el laboratorio antes de la implementación utilizando muestras con una tipología conocida.
2. La PCR y el ensayo descritos en este prospecto requieren condiciones controladas de manera precisa. Cualquier desviación de los parámetros que se hayan validado puede traducirse en un falló del producto.
3. Si al menos el 50 % de los fragmentos de ADN iniciales es inferior a 10 kb, puede que no se genere una cantidad suficiente de producto de PCR de gran alcance.
4. Si la concentración de la biblioteca final es inferior a 10 nM, puede que no se obtengan resultados de secuenciación precisos.
5. Se observarán ambigüedades en el 4.º campo debido a la falta de cobertura en la región del intrón. Se ha validado la precisión de la tipificación del HLA hasta el 3.º campo.
6. Deberán utilizarse el bromuro de etidio o GelRed™ para la visualización de los productos de PCR.
7. Las regiones cubiertas por los exones amplificados por los cebadores se utilizan para determinar la tipificación del HLA. El software informará de ambigüedades conocidas debido a la falta de cobertura del exón 1 y el exón 5 de DPB1, el exón 6 de DQB1, las primeras bases del exón 2 y 4 de DPB1, y el exón 6 de DRB1, y las últimas bases del exón 4 de DPA1. El software no detectará ningún alelo nuevo en estas regiones.
8. La falta de secuencias de referencia genómica para DPB1 y los bajos niveles de polimorfismo en el intrón 2 (entre el exón 2 y 3) pueden dar como resultado una ambigüedad de fase que no pueda resolverse y se informará de ella en función de la versión de la base de datos del software.
9. Los loci de DRB se amplifican como dos fragmentos: uno que amplifica el exón 1 y otro que amplifica los exones 2 a 6. El intrón 1 no se amplifica en su totalidad. Por lo tanto, el ajuste de fase de todo el locus no es posible para DRB1/3/4/5.
10. En la mayoría de los casos, los productos de amplificación del exón 1 de DRB1/3/4/5 se asignan de manera deficiente al exón 1 de las secuencias de referencia conocidas de DRB5; por ello, es muy probable que no se genere el contig del exón 1 para DRB5. Dado que no hay polimorfismos del exón 1 conocidos para DRB5, no se generará ninguna ambigüedad en la tipificación del HLA para DRB5.
11. En el caso en el que DRB4 esté infrarrepresentado en los datos, puede que el software no detecte automáticamente la tipificación y muy a menudo se puede contar con la asignación para confirmar que el alelo DRB4 está presente. La tipificación de DRB1 puede usarse para comprobar la presencia o ausencia del DRB4. En el caso en el que no puedan determinarse los alelos, se requiere confirmación de tipificación de DRB4 adicional. Debido a la región de borrado de DRB4\*03:01N, este alelo no se puede detectar.
12. La falta de polimorfismos en una región de determinadas combinaciones de alelos de genes de clase I y clase II del HLA puede dificultar la determinación de la fase correcta para muestras heterocigóticas. Esto se debe a que la longitud de las lecturas de secuenciación en la plataforma de secuenciación no es lo suficientemente larga como para captar los polimorfismos distantes en la lectura de la secuenciación de par final. Por consiguiente, puede que haya una ambigüedad de fase que no se pueda resolver.
13. Debido a la naturaleza compleja de la tipificación del HLA, la revisión de la interpretación de los datos y las asignaciones de tipificación deben realizarse personal cualificado. Debe prestarse especial atención al revisar las determinaciones homocigóticas para asegurarse de que el software no haya pasado por alto un segundo alelo y deben revisarse los alelos nulos para comprobar la asignación.
14. En los casos en los que la cobertura de lectura general sea inferior a 40, el software mostrará la tipificación como datos insuficientes. Sin embargo, se proporcionan todos los datos necesarios para revisar dicha tipificación. El usuario puede revisar las pruebas para determinar si se puede obtener la tipificación correcta del HLA. Recomendamos las siguientes pautas para sobrescribir la llamada mediante la función OWI provista en el software.
  - i. La cobertura media es mayor de 15 para el HLA de clase I y de 20 para el HLA de clase II.
  - ii. El diagrama de cobertura de cDNA no debe alcanzar el nivel de referencia como consecuencia de la baja cobertura de cualquiera de los alelos seleccionados del HLA.
  - iii. El usuario puede verificar las variantes mediante la información de asignación o de fase mostrada en el software.
15. La guía de usuario del software cuenta con las mejores prácticas recomendadas e instrucciones detalladas sobre el uso del software, así como directrices sobre combinaciones complejas de tipificación del HLA.

## CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO

Se realizaron estudios clínicos en tres centros para evaluar el rendimiento del kit de tipificación del HLA MIA FORA NGS HLA Typing Kit. El rendimiento del ensayo se comparó con tipificaciones previas que incluyeron la tipificación basada en la secuencia (SBT) de alta resolución, si estaba disponible, y una tipificación de menor resolución cuando la SBT no estaba disponible. Las muestras las seleccionaron los centros de ensayo para representar un conjunto variado de diferentes tipos de HLA que pueden encontrarse durante el transcurso de operaciones normales. En los centros, se analizaron un total de 206 muestras en 3 series junto con dos lotes de reactivos en cada una. Se determinó la tipificación del HLA para los locus HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 y HLA-DRB1/3/4/5. Se evaluó un total de 3692 alelos con estas 206 muestras. Los resultados mostraron que los tipos de HLA obtenidos mediante el ensayo MIA FORA, sin repetir el ensayo en locus discordantes o fallos, presentaban una concordancia del 99,34 %. Tras repetir el ensayo en los locus con fallos o discordantes, la concordancia general fue del 99,74 %.

Nota: los datos siguientes representan el rendimiento del MIA FORA NGS HLA Typing Kit (kit de tipificación del HLA) original. No se han realizado nuevos estudios clínicos con el kit MIA FORA MFlex; no obstante, el análisis de MFlex se validó rigurosamente con respecto al producto MIA FORA original y se determinó que el rendimiento era equivalente en todos los estudios realizados.

**Tabla 8: Resumen de concordancia general**

Centro	Número de muestras	Número de locus analizados	Número de alelos para análisis de concordancia	Concordancia tras repetición de ensayo
Site1	68	748	1223	1220 (99,75 %)
Site2	69	759	1064	1063 (99,91 %)*
Site3	69	759	1241	1236 (99,59 %)

\* En este centro no se repitieron los ensayos. Un locus de DQB1 no mostró datos suficientes.

**Tabla 9: Resumen de ensayos clínicos por locus**

Locus de HLA	Concordancia inicial	Concordancia tras repetición de ensayo**
HLA-A	100,00 %	100,00 %
HLA-B	99,76 %	99,76 %
HLA-C	99,51 %	100,00 %
DPA1	99,72 %	100,00 %
DPB1	99,41 %	99,72 %
DQA1	99,26 %	100,00 %
DQB1	98,48 %	99,27 %
DRB1	98,54 %	99,03 %
DRB3/4/5	99,43 %	100,00 %
<b>Total</b>	<b>99,34 %</b>	<b>99,74 %</b>

\*\* Las repeticiones de los ensayos incluyeron llamadas que se marcaron para su revisión y que no pudieron resolverse con una inspección manual de los datos. Las llamadas que no pudieron realizarse debido a datos insuficientes (11/1854 amplificaciones) también se volvieron a analizar.

NOTA: para obtener información detallada sobre características de rendimiento específicas, llame a Immucor, Inc. al (855) 466-8267.

Paula Zucchini  
Farmacéutica  
M.N. 12.855

Página 16 de 16  
Copyright © 2016, Immucor Inc. Todos los derechos reservados.

SR-150-10726-EG Rev A (08-2020)

REINOMEDICA S.R.L.  
GUSTAVO A. REINOSO  
Socio Gerente

## SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	CAUSA POSIBLE	SOLUCIÓN	
No hay bandas en el gel después de la amplificación mediante PCR	Cantidad o calidad del ADN	Cociente OD 260/280 inferior a 1,65	Vuelva a purificar el ADN para eliminar cualquier impureza.
		ADN fragmentado. Al menos el 50 % del ADN debe ser mayor de 10 kb.	Vuelva a extraer el ADN de la muestra.
		ADN diluido en Tris-HCl o TE	Diluya las muestras en agua.
		Baja concentración de plantilla de ADN	Asegúrese de que la concentración de ADN es de 50 a 150 ng/reacción.
		Pérdida de amplificación	Repita la PCR para las pérdidas de amplificación con reactivos sobrantes, que tengan volumen suficiente para cuatro muestras. Los reactivos sobrantes almacenados a 2-8 °C son estables durante una semana.
Varias bandas o trazas de bandas tras la amplificación mediante PCR	Condiciones del termociclador	Velocidades de aumento	Asegúrese de que las velocidades de aumento son las especificadas en el protocolo.
		Temperatura	Calibre la máquina de PCR para verificar el rendimiento de las máquinas de PCR.
		Calidad del ADN	Asegúrese de que el ADN está diluido en agua y sin contaminantes.
Selección de tamaño de ADN incorrecta	Instrumento Pippin	Compruebe el perfil de elución para asegurarse de que la elución se ha producido sin errores.	Siga la guía de solución de problemas de Sage Science para determinar si el rendimiento del instrumento cumple las especificaciones.
		Instrumento no calibrado	Procese 2 µl de 1 kb junto con cadena (ThermoFisher) con un protocolo de escisión de 400 a 600 pares de bases. Procesa 15 µl de producto eluido en gel de agarosa para visualizar la elución de un fragmento de 500 pb.
		Reutilización de cartucho Pippin	El cartucho Pippin solo debe utilizarse una vez.
Selección de tamaño de ADN incorrecta	Selección de tamaño basada en bolas	Baja concentración de biblioteca	Asegúrese de que los volúmenes especificados en la guía del usuario para la selección basada en bolas se sigan cuidadosamente. Un volumen de bolas incorrecto generará una gran cantidad de fragmentos más pequeños.
Baja concentración de biblioteca amplificada	Limpieza con bolas magnéticas.	Etanol no eliminado por completo	Retire el etanol con las placas sobre el soporte magnético. Retire todas las trazas de etanol, especialmente después del lavado final.
		Bolas almacenadas incorrectamente	Almacene las bolas a una temperatura entre 2 y 8 °C: NO LAS CONGEELE.
		El etanol no está recién preparado.	Debe preparar etanol al 80 % fresco antes de cada uso.
		Sobresecado de bolas	El tiempo de secado puede depender de la humedad y de la temperatura ambiente. Vigile estrechamente las bolas para asegurarse de que estas no se sequen en exceso y ajuste el protocolo según sea necesario.
	Se ha empleado una concentración incorrecta de Tris-HCl.	Asegúrese de que el tampón de Tris-HCl es de 10 mM y que tiene un pH de 8,0.	
	Pippin Prep no eluye el ADN.	Compruebe la presencia de productos ligados al adaptador antes y después de la elución.	Amplifique 1 µl de biblioteca limpia agrupada previa al procesamiento con Pippin con la mitad de la cantidad de reactivos para la amplificación de bibliotecas. Procesa los productos amplificados (no es necesario llevar a cabo una purificación) en un gel de agarosa al 2 % para determinar la presencia de muestras de fragmentos.
		Producto amplificado perdido durante la limpieza con bolas	Vuelva a amplificar 15 µl de elución. Si la biblioteca es > 25 nM, los productos pueden visualizarse procesando 5 µl en un gel de agarosa.
Error en la fragmentación a través de los pasos de ligación	Problemas de fragmentación	Purifique 20 µl de 2-3 muestras ligadas y el NTC con el protocolo de limpieza con bolas usando bolas de 36 µl. Eluya los productos en 10 µl y compruebe si hay fragmentación en un gel de agarosa al 2 %. Si no se ha producido la fragmentación, llame al servicio de asistencia técnica para obtener instrucciones para solucionar el problema.	
Agrupación inferior a lo esperado	Cuantificación de bibliotecas incorrecta	Fluorómetro Qubit	Siga las instrucciones del fabricante prestando especial atención a las diluciones y empleando nuevas diluciones de patrón. Si la concentración de muestra cae por debajo de la curva del patrón de los reactivos de amplio rango, repita el análisis con el ensayo de alta sensibilidad.
	Reactivos de Illumina	Problemas con la celda de flujo, el instrumento o los reactivos	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina para solucionar los problemas con los reactivos y los instrumentos.
* Se puede observar una mayor cantidad de dímeros de adaptadores de índices como lecturas en el NTC de la página de estadísticas.	Cantidad excesiva de dímeros de cebadores de adaptadores realizados a través del ensayo		Mida con precisión los volúmenes de bolas magnéticas durante la purificación.
			Compruebe visualmente la punta de la pipeta para asegurarse de que no caigan gotas.
			El etanol al 80 % debe estar recién preparado a partir de las existencias de etanol de alta calidad.
			Mientras se realiza la purificación posterior a la amplificación con el método de selección de tamaño basado en bolas, se debe tener cuidado durante la transferencia del sobrenadante.
			Opcionalmente, se puede realizar una limpieza adicional con bolas de tamaño 0,6x para disminuir estos dímeros que se llevan a cabo a través de la secuenciación, pero es posible que, como consecuencia de esto, se produzca una concentración de biblioteca más baja.

**\*Los dímeros de cebadores de adaptadores no tienen impacto en la correcta tipificación del HLA de las muestras**

## LIMITACIÓN DE LA LICENCIA

**IMPORTANTE. LEA DETENIDAMENTE.** Este Acuerdo de licencia de etiquetado ("Acuerdo") es el acuerdo legal entre usted (de aquí en adelante, "Licenciario") e Immucor Transplant Diagnostics, Inc. ("Immucor") (de manera individual, una "Parte" o en conjunto, las "Partes") para el uso de los reactivos proporcionados con este documento ("Reactivos"). A través del uso de los Reactivos, el Licenciario acepta vincularse a los términos dispuestos en este Acuerdo.

1. Uso de reactivos por parte del Licenciario. Immucor concede al Licenciario el derecho no exclusivo e intransferible a utilizar exclusivamente la cantidad transferida de los Reactivos únicamente de acuerdo con los procedimientos dispuestos en el etiquetado adjunto y sujeto a las limitaciones dispuestas en este Acuerdo. La titularidad de los Reactivos no se transferirá al Licenciario. Immucor conserva todos los demás derechos no concedidos de manera expresa en este Acuerdo, ni concede ninguna otra licencia implícita.
2. Usos excluidos. En virtud de este Acuerdo no se concede ningún permiso al Licenciario para que utilice los Reactivos que no sean los designados en la Sección 1 de este Acuerdo. Específicamente, no se concede ningún permiso al Licenciario para que utilice los Reactivos con el objeto de transferir, vender, divulgar o proporcionar acceso de cualquier otra forma a los Reactivos o al producto Mía Fora a terceros. El Licenciario no tendrá derecho a producir derivados de ningún Reactivo ni a autorizar a terceros a que utilicen o vendan ningún Reactivo ni derivados de los Reactivos. El Licenciario reconoce que algunos Reactivos y sus usos están sujetos a patentes de terceros y que estos son utilizados bajo licencia por Immucor. El Licenciario no deberá utilizar los Reactivos, excepto para los usos permitidos de manera explícita dispuestos en este Acuerdo.
3. Términos de indemnización y de uso indebido de Reactivos. Conforme a lo dispuesto por ley, el Licenciario defenderá, indemnizará y exonerará a Immucor, las filiales de Immucor, sus gestores, directores, dirigentes, empleados, patrocinadores y agentes (denominados conjuntamente las "Partes Indemnizadas") frente a cualquier o toda responsabilidad, pérdida, daño, reclamación o gasto, incluidos los honorarios de abogados (denominados conjuntamente "Pérdidas de las Partes Indemnizadas") que se deriven de este Acuerdo o que guarden relación con este, incluidas, sin carácter restrictivo, las Pérdidas de las Partes Interesadas resultantes de cualquier uso por parte del Licenciario o en su nombre. El Licenciario indemnizará y exonerará a las Partes Indemnizadas frente a las Pérdidas de las Partes Indemnizadas, ya sea en parte o en su totalidad, que se deriven, resulten o guarden relación con una infracción de este Acuerdo por parte del Licenciario; así como frente a reclamaciones por parte de un tercero porque el Licenciario o el uso de los Reactivos por parte del Licenciario infrinja o se apropie indebidamente de cualquier patente, derecho de autor, marca comercial, secreto comercial o cualquier otro derecho de propiedad intelectual de dicho tercero.
4. Este Acuerdo se aplica exclusivamente a los Reactivos. Todo uso del software Mía Fora está sujeto al Acuerdo de Licencia de Usuario Final correspondiente. Este Acuerdo debe interpretarse e implementarse de acuerdo con las leyes del Estado de Nueva York en Estados Unidos. Si el comprador no desea aceptar los términos de este Acuerdo, Immucor aceptará la devolución del producto.

**Fabricante:** BioArray Solutions Ltd., 35 Technology Drive, Suite 100, Warren, N. 07059 (EE. UU.) Teléfono: (908) 226-8200, Fax: (908) 226-0800

**REPRESENTANTE** **Representante autorizado:** Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Robert-Bosch-Straße 32, 63303 Dreieich, ALEMANIA  
Teléfono: +49 (0) 6103 80560, Fax: +49 (0) 6103 8056199



**Servicio de asistencia técnica en Europa:** Teléfono: +32 (0)3 385 47 91

## MARCAS COMERCIALES UTILIZADAS

MIA FORA es una marca comercial de Sirona Genomics, Inc.  
Todas las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios.

Paula Zucchini  
Farmaceutica  
M.N. 12.855

PECHANO 10  
Copyright © 2019 Immucor Inc. Todos los derechos reservados.

SF-1000-029-ES Rev A (08-2020)

BIOMEDICA S.R.L.  
JUSTAVO A. REINOSO  
Gerente

# MIA FORA™

NGS

## Guía del usuario del software, v5.X Servidor Linux

Software avanzado para el genotipado NGS del HLA

**Declaración de copyright**

Esta documentación y el software MIA FORA NGS son información confidencial y están protegidos por copyright, © 2015, de Sirona Genomics, Inc. Todos los derechos reservados. Nada de esta documentación ni del software puede reproducirse, copiarse, exhibirse, transmitirse, modificarse ni utilizarse sin la previa autorización por escrito de Sirona Genomics, Inc.

**Exención de responsabilidad**

El software MIA FORA NGS tiene la marca CE de la Unión Europea solo para su uso con fines de diagnóstico in vitro (IVD) junto con MIA FORA NGS FLEX HLA Typing Kit (kit de tipificación del HLA), con números de referencia SR-800-00433-24 (FLEX11), SR-800-00534-24 (MFLEX11), SR-800-00433-96 (FLEX11), SR-800-00534-96 (MFLEX11), SR-800-00433-1152 (FLEX11), SR-800-00441-24 (FLEX9), SR-800-00441-96 (FLEX9), SR-800-00441-1152 (FLEX9), SR-800-00440-24 (FLEX6), SR-800-00535-24 (MFLEX6), SR-800-00440-96 (FLEX6), SR-800-00535-96 (MFLEX6), SR-800-00440-1152 (FLEX6), SR-800-00439-24 (FLEX5), SR-800-00439-96 (FLEX5) y SR-800-00439-1152 (FLEX5).

El software MIA FORA NGS tiene la marca CE de la Unión Europea solo para su uso con fines de diagnóstico in vitro (IVD) junto con MIA FORA NGS FLEX HLA Typing Kit (kit de tipificación del HLA), con números de referencia SR-800-10433-24 (FLEX11), SR-800-10534-24 (MFLEX11), SR-800-10433-96 (FLEX11), SR-800-10534-96 (MFLEX11), SR-800-10433-1152 (FLEX11), SR-800-10441-24 (FLEX9), SR-800-10441-96 (FLEX9), SR-800-10441-1152 (FLEX9), SR-800-10440-24 (FLEX6), SR-800-10535-24 (MFLEX6), SR-800-10440-96 (FLEX6), SR-800-10535-96 (MFLEX6), SR-800-10440-1152 (FLEX6), SR-800-10439-24 (FLEX5), SR-800-10439-96 (FLEX5) y SR-800-10439-1152 (FLEX5).

COPYRIGHT © 2020 DE IMMUCOR, INC

Esta documentación es información confidencial y están protegidos por copyright, © 2020, de Immucor, Inc. Todos los derechos reservados. Nada de esta documentación ni del software puede reproducirse, copiarse, exhibirse, transmitirse, modificarse ni utilizarse sin la previa autorización por escrito de Immucor, Inc.

**Marcas comerciales**

MIA FORA es una marca comercial propiedad de Sirona Genomics, compañía de Immucor.

Las demás marcas comerciales y marcas comerciales registradas son propiedad de sus correspondientes propietarios.

El uso del software MIA FORA y de esta documentación está sujeto a lo especificado en los términos y condiciones de la licencia de MIA FORA, disponibles en [www.immucor.com/miaforasoftwareterms](http://www.immucor.com/miaforasoftwareterms). AL USAR EL SOFTWARE MIA FORA FLEX O ESTA DOCUMENTACIÓN, USTED RECONOCE QUE HA LEÍDO, COMPRENDE Y ACEPTA ESTAR VINCULADO POR ESTOS TÉRMINOS Y CONDICIONES, QUE PUEDEN SER ACTUALIZADOS OCASIONALMENTE.

Índice

<b>1.</b>	<b>Introducción al software MIA FORA NGS .....</b>	<b>6</b>
1.1.	Estrategia de genotipado.....	6
1.2.	Alineación competitiva de alelos de referencia .....	7
1.3.	Cálculo de la secuencia de consenso por ajuste de fase .....	8
1.4.	Cobertura de la lectura central .....	9
1.5.	Genotipos calculados .....	10
1.6.	Sistema de marcado inteligente .....	10
<b>2.</b>	<b>Procedimientos iniciales.....</b>	<b>12</b>
2.1.	Inicio de sesión .....	12
2.2.	Panel Preference.....	16
2.3.	Gestión de los usuarios .....	16
2.4.	Información sobre renuncia de responsabilidad .....	17
2.5.	Información del laboratorio.....	18
2.6.	Formato de fecha y hora .....	19
2.7.	Formato de informe .....	19
2.8.	Opciones de revisión .....	22
2.9.	Sirona Quant Options.....	25
2.10.	Analysis Options .....	26
2.11.	Transferencia de archivos entre el servidor y la máquina del usuario a través de VNC Viewer.....	34
<b>3.</b>	<b>Ventanas Projects.....</b>	<b>36</b>
3.1.	Creación de un nuevo proyecto .....	37
3.2.	Lanzamiento del análisis de datos.....	41
3.3.	Ventana de estadísticas.....	42
<b>4.</b>	<b>Ventana de revisión .....</b>	<b>46</b>
<b>5.</b>	<b>Ventana de detalles .....</b>	<b>47</b>
5.1.	Bloque A. Información de la muestra .....	48
5.2.	Bloque B. Tabla de genotipos .....	50

5.3. **Bloque C. Variantes, sugerencia de LD y guía inteligente** ..... 60

5.4. **Bloque D. Tabla de alelos candidatos** ..... 62

5.5. **Bloque E1. Diagramas de cobertura** ..... 68

5.6. **Bloque E2. Exploradores de alineación**..... 72

5.7. **Bloque E3. Alineación de referencia**..... 75

5.8. **Filtro Allele Search** ..... 82

5.9. **Bloque F. Explorador de alineación de cóntigos**..... 83

5.9.1. Interacción entre la tabla de variantes y el explorador de alineación de cóntigos ..... 85

5.9.2. Interacción entre el explorador de cDNA y el explorador de alineación de cóntigos ..... 86

5.9.3. Interacción entre el explorador genómico y el explorador de alineación de cóntigos ..... 86

5.9.4. Interacción entre el diagrama de cobertura genómica y el explorador de alineación de cóntigos ..... 87

5.9.5. Interacción entre el diagrama de cobertura de cDNA y el explorador de alineación de cóntigos ..... 88

5.9.6. Interacción entre el diagrama de cobertura de cDNA y el explorador de alineación de cDNA ..... 88

5.9.7. Interacción entre el diagrama de cobertura genómica y el explorador de alineación genómica ..... 89

5.9.8. Interacción entre explorador de alineación de consenso y los informes ..... 90

5.9.9. Advertencias de varios usuarios ..... 91

5.9.10. Mensaje de advertencia para cualquier alelo del HLA sin información de referencia genómica ... 91

6. **Ventana de resumen**..... 93

7. **Herramientas auxiliares**..... 95

8. **Apéndice A. Descripción de colores del software** ..... 106

8.1. Tabla de variantes ..... 106

8.2. Tabla de genotipos ..... 106

8.3. Vista de la placa con la distribución de códigos de barras ..... 107

8.4. Tabla de sugerencia de LD ..... 108

8.5. Tabla de alelos candidatos ..... 108

8.6. Guía inteligente ..... 109

9. **Apéndice B. Glosario**..... 110

10. **Apéndice C. Cobertura de genes general** ..... 112

11. **Apéndice D. Limitación de software** ..... 113

12. **Apéndice E. Prácticas recomendadas**..... 114

13. **Apéndice F. Funciones seleccionables haciendo clic** ..... 118

13. **Funciones principales de proyecto de MIA FORA NGS** ..... 118

- 13.2. Ventana de estadísticas ..... 118
- 13.3. Ventana de detalles ..... 118
- 13.4. Ventana de revisión ..... 119
- 13.5. Ventana de resumen ..... 120
- 14. **Apéndice G. Otros recursos** ..... 121
- 15. **Apéndice H. Licencias de bibliotecas de terceros** ..... 122
- 16. **Apéndice I. Requisitos mínimos de hardware** ..... 132
- 17. **Apéndice J. Herramientas adicionales** ..... 133
  - 17.1. **runQC** ..... 133
    - 17.1.1. Ayuda ..... 133
    - 17.1.2. Versión ..... 134
    - 17.1.3. Nivel de locus ..... 134
    - 17.1.4. Información de control de calidad ..... 135
    - 17.1.5. Información de control de calidad con opción ampliada ..... 137
    - 17.1.6. Información de control de calidad con opción homocigótica repetida ..... 137
  - 17.2. **Exporthml** ..... 137
  - 17.3. **percentcompleted.sh** ..... 141

# 1. Introducción al software MIA FORA NGS

El software MIA FORA NGS proporciona información sobre la tipificación del HLA con los principales genes de clase I (HLA-A, B y C) y clase II (DPA1, DPB1, DQA1, DQB1, DRB1 y DRB3/4/5). Los genotipos se calculan a partir de las lecturas masivas de secuenciación de extremos emparejados ("paired-end") obtenidas en la plataforma de secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing, NGS) de Illumina. El software MIA FORA NGS proporciona información genotípica del HLA precisa y definida por la fase.

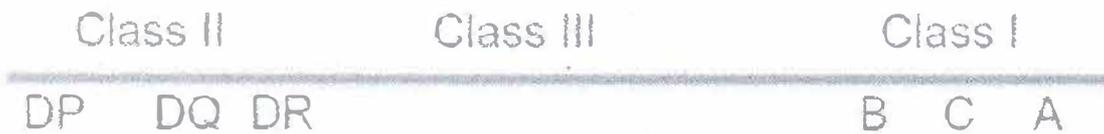


Figura 1-1: región genética del HLA con las ubicaciones relativas de los genes de clase I y clase II del HLA.

Los genes del HLA forman parte de las regiones más complicadas del genoma humano, y su secuenciación precisa y completa conlleva un esfuerzo enormemente complejo. El software MIA FORA NGS ha sido diseñado para aprovechar al máximo la tecnología NGS y proporcionar a los usuarios una herramienta de uso sencillo para tomar la decisión correcta ante una determinación de tipificación del HLA exenta de ambigüedades.

El software está diseñado para identificar correctamente los genotipos del HLA basándose en la secuencia de codificación. Se da una consideración especial a las regiones de exones con mayor grado de secuenciación, a saber, los exones 2 y 3 de los genes de clase I y el exón 2 de los genes de clase II. Por ahora, se ha hecho menos hincapié en la identificación de variantes de intrones. El software MIA FORA NGS ofrece una interfaz gráfica de usuario (GUI) intuitiva, y cumple los requisitos establecidos por la comunidad del HLA. Con este software, los usuarios disponen de: en primer lugar, genotipos del HLA exactos y sin ambigüedades basados en la última nomenclatura del IMGT; en segundo lugar, la secuencia completa con fase ajustada cubierta por los cebadores objetivo utilizados para interrogar los genes del HLA.

Nota: Las vistas de pantalla reales pueden diferir de algunas de las capturas de pantalla presentes.

## 1.1. Estrategia de genotipado

El software MIA FORA NGS combina dos estrategias informáticas complementarias para analizar cada muestra y, después, efectúa determinaciones de genotipado con genes objetivo del HLA mediante la puntuación de fiabilidad calculada. La primera estrategia clasifica los alelos candidatos calculados en función de métricas de



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional  
Las Malvinas son argentinas

**Hoja Adicional de Firmas**  
**Informe gráfico**

**Número:**

**Referencia:** Rótulos y manuales

---

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 71 pagina/s.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica  
Date: 2022.05.05 14:43:26 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental  
Electronica  
Date: 2022.05.05 14:43:29 -03:00



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional  
Las Malvinas son argentinas

**Certificado - Redacción libre**

**Número:**

**Referencia:** EX-2021-114575734 -APN-DGA#ANMAT

---

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN

PRODUCTOS MÉDICOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

N° EX-2021-114575734 -APN-DGA#ANMAT

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que de acuerdo con lo solicitado por la firma HEMOMEDICA S.R.L. se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), de los nuevos productos médicos para diagnóstico de uso in vitro con los siguientes datos:

**NOMBRE COMERCIAL:** 1) SR-850-00043 MIA FORA NGS FLEX Software. 2) SR-800-10534-24 MIA FORA NGS MFLEX 11 HLA Typing Kit. 3) SR-800-10534-96 MIA FORA NGS MFLEX 11 HLA Typing Kit. 4) SR-800-10534-1152 MIA FORA NGS MFLEX HT 11 HLA Typing Kit. 5) SR-800-10535-24 MIA FORA NGS MFLEX 6 HLA Typing Kit. 6) SR-800-10535-96 MIA FORA NGS MFLEX 6 HLA Typing Kit. 7) SR-800-10535-1152 MIA FORA NGS MFLEX HT 6 HLA Typing Kit.

**INDICACIÓN DE USO:** 1) El software está diseñado para identificar correctamente los genotipos del HLA basándose en la secuencia de codificación. Se da una consideración especial a las regiones de exones con mayor grado de secuenciación, a saber, los exones 2 y 3 de los genes de clase I y el exón 2 de los genes de clase II. Por ahora, se ha hecho menos hincapié en la identificación de variantes de intrones. El software MIA FORA NGS ofrece una interfaz gráfica de usuario (GUI) intuitiva y cumple los requisitos establecidos por la comunidad del

HLA. Con este software, los usuarios disponen de en primer lugar, genotipos del HLA exactos y sin ambigüedades basados en la última nomenclatura del IMGT, en segundo lugar, la secuencia completa con fase ajustada cubierta por los cebadores objetivo utilizados para interrogar los genes del HLA. 2) Y 3) El Kit MIA FORA NGS MFlex 11 se ha concebido para la amplificación y secuenciación de los genes del HLA: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB-1/3/4/5, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DPA1 y HLADPB1 en la plataforma de secuenciación de la nueva generación de Illumina. El software MIA FORA se ha diseñado como guía para determinar el tipo HLA a partir de los datos que se hayan generado con el MIA FORA NGS MFlex 11 Library Prep Kit (kit 11 para preparación de bibliotecas). El ensayo se ha concebido para su uso en un laboratorio especializado y experto en la manipulación de ADN para su amplificación y secuenciación. 4) El Kit MIA FORA NGS MFlex 11 se ha concebido para la amplificación y secuenciación de los genes del HLA: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLADRB-1/3/4/5, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DPA1 y HLA-DPB1 en la plataforma de secuenciación de la nueva generación de Illumina. El software MIA FORA se ha diseñado como guía para determinar el tipo HLA a partir de los datos que se hayan generado con el MIA FORA NGS MFlex Library Prep Kit (kit para preparación de bibliotecas). El ensayo se ha concebido para su uso en un laboratorio especializado y experto en la manipulación de ADN para su amplificación y secuenciación. El ensayo se ha concebido para procesarse como panel de 384 hasta 576 muestras. Los resultados se han validado con el software MIA FORA NGS. 5) Y 6) El Kit MIA FORA NGS MFlex 6 se ha concebido para la amplificación y secuenciación de los genes del HLA: HLA-A, HLA-B, “AÑO. HLA-C, HLA-DRB-1, HLA-DQB1, HLA-DPB1 en la plataforma de secuenciación de la nueva generación de Illumina. El software MIA FORA se ha diseñado como guía para determinar el tipo HLA a partir de los datos que se hayan generado con el MIA FORA NGS MFlex 6 Library Prep Kit (kit 6 para preparación de bibliotecas). El ensayo se ha concebido para su uso en un laboratorio especializado y experto en la manipulación de ADN para su amplificación y secuenciación. 7) El Kit MIA FORA NGS MFlex 6 se ha concebido para la amplificación y secuenciación de los genes del HLA: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 y HLA-DPB1 en la plataforma de secuenciación de la nueva generación de Illumina. El software MIA FORA se ha diseñado como guía para determinar el tipo HLA a partir de los datos que se hayan generado con el MIA FORA NGS MFlex Library Prep Kit (kit para preparación de bibliotecas). El ensayo se ha concebido para su uso en un laboratorio especializado y experto en la manipulación de ADN para su amplificación y secuenciación. El ensayo se ha concebido para procesarse como un panel de 384 hasta 576 muestras. Los resultados se han validado con el software MIA FORA NGS.

**FORMA DE PRESENTACIÓN:** 1) No aplica; 2) Envases por 24 determinaciones conteniendo: A) MIA FORA NGS MFlex 11 PCR kit (kit 11 para PCR), 24 ensayos, con un (1) vial por 450ul. B) MIA FORA NGS Mflex 11 Library Prep kit (kit para preparación de bibliotecas), 24 ensayos con siete (7) viales y una (1) placa adaptadora de índices: L1, mezcla enzimática primaria; L2, mezcla de tampón primaria; L3, enzima ligasa; L4, 2x tampón de ligasa; L5, Mezcla de tampón/ enzima para PCR; L6, Cebadores de amplificación; L7, Agua sin nucleasas; placa adaptadora de índices. 3) Envases por 96 determinaciones conteniendo: A) MIA FORA NGS MFlex 11 PCR kit (kit 11 para PCR), 96 ensayos con un (4) viales por 450ul. B) MIA FORA NGS Mflex 11 Library Prep kit (kit 11 para preparación de bibliotecas), 96 ensayos con ocho viales y una (1) placa adaptadora de índices: L1, mezcla enzimática primaria; L2, mezcla de tampón primaria; L3, enzima ligasa; L4, 2x tampón de ligasa; L5, Mezcla de tampón/ enzima para PCR; L6, Cebadores de amplificación; L7, Agua sin nucleasas; placa adaptadora de índices. 4) Envases por 1152 determinaciones conteniendo: A) MIA FORA NGS MFlex 11 HT PCR kit (kit 11 para PCR) con un vial por 20ml. B) MIA FORA NGS Library Prep kit (kit para preparación de bibliotecas), 1152 ensayos con ocho viales y doce (12) placas adaptadoras de índices: L1, mezcla enzimática primaria; L2, mezcla de tampón primaria; L3, enzima ligasa; L4, 2x tampón de ligasa; L5, Mezcla de tampón/ enzima para PCR; L6, Cebadores de amplificación; L7, Agua sin nucleasas; 12 placas adaptadoras de índices. c) MIA FORA NGS HLA Magnetic Beads (bolas magnéticas) 5) Envases por 24 determinaciones conteniendo: A) MIA FORA NGS MFlex 6 PCR kit

(kit 6 para PCR), 24 ensayos, con un (1) vial por 450ul. B) MIA FORA NGS Mflex 6 Library Prep kit (kit para preparación de bibliotecas), 24 ensayos con siete (7) viales y una (1) placa adaptadora de índices: L1, mezcla enzimática primaria; L2, mezcla de tampón primaria; L3, enzima ligasa; L4, 2x tampón de ligasa; L5, Mezcla de tampón/ enzima para PCR; L6, Cebadores de amplificación; L7, Agua sin nucleasas; placa adaptadora de índices. 6) Envases por 96 determinaciones conteniendo: A) MIA FORA NGS MFlex 6 PCR kit (kit 6 para PCR), 96 ensayos con un (4) viales por 450ul. B) MIA FORA NGS Mflex 6 Library Prep kit (kit 6 para preparación de bibliotecas), 96 ensayos con ocho viales y una (1) placa adaptadora de índices: L1, mezcla enzimática primaria; L2, mezcla de tampón primaria; L3, enzima ligasa; L4, 2x tampón de ligasa; L5, Mezcla de tampón/ enzima para PCR; L6, Cebadores de amplificación; L7, Agua sin nucleasas; placa adaptadora de índices. 7) Envases por 1152 determinaciones conteniendo: A) MIA FORA NGS MFlex 6 HT HLA PCR kit (kit para la PCR del HLA) con un vial por 20ml. B) MIA FORA NGS Library Prep kit (kit para preparación de bibliotecas), 1152 ensayos con ocho viales y doce (12) placas adaptadoras de índices: L1, mezcla enzimática primaria; L2, mezcla de tampón primaria; L3, enzima ligasa; L4, 2x tampón de ligasa; L5, Mezcla de tampón/ enzima para PCR; L6, Cebadores de amplificación; L7, Agua sin nucleasas; 12 placas adaptadoras de índices. c) MIA FORA NGS HLA Magnetic Beads (bolas magnéticas).

**PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN:** 36 meses desde la fecha de elaboración, conservado entre -20 y -80°C.

**NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE:** BioArray Solutions Ltd. 35 Technology Drive, Suite 100 Warren NJ 07059, USA.

**CATEGORÍA:** Uso profesional exclusivo.

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del PRODUCTO PARA DIAGNOSTICO IN VITRO PMN°-1049-66. -----

N° EX-2021-114575734 -APN-DGA#ANMAT

AM