



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Disposición

Número:

Referencia: 1-0047-3110-002043-24-3

VISTO el Expediente N° 1-0047-3110-002043-24-3 del Registro de esta Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), y:

CONSIDERANDO:

Que por las presentes actuaciones CROMOION S.R.L. solicita se autorice la inscripción en el Registro Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de esta Administración Nacional, de un nuevo/s Producto/s Médico/s para diagnóstico in vitro, Nombre descriptivo: AlloSeq, para la determinación de antígenos HLA clase I y II.

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico in vitro que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización .

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 y normas complementarias.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que corresponde autorizar la inscripción en el RPPTM del producto médico objeto de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 y sus modificatorias.

Por ello;

LA ADMINISTRADORA 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) del producto médico para diagnóstico de uso in vitro, Nombre descriptivo: AlloSeq, para la determinación de antígenos HLA clase I y II, de acuerdo con lo solicitado por CROMOION S.R.L. con los Datos Característicos que figuran al pie de la presente.

ARTÍCULO 2º.- Autorízase los textos de los proyectos de rótulo/s y de instrucciones de uso que obran en documento N° IF-2024-55995553-APN-DVPCYAR#ANMAT .

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda "Autorizado por la ANMAT PM 908-248 ", con exclusión de toda otra leyenda no contemplada en la normativa vigente.

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

ARTÍCULO 5º.- La vigencia del Certificado de Autorización será de cinco (5) años, a partir de la fecha de la presente disposición.

ARTÍCULO 6º.- Regístrese. Inscríbase en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica al 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 descriptivo: AlloSeq, para la determinación de antígenos HLA clase I y II

Marca comercial: AlloSeq

Modelos:

Alloseq Tx 17 / AlloSeq Tx 9 / AlloSeq Assign

Indicación/es de uso:

- AlloSeq Tx 17 / AlloSeq Tx 9: Utilizados para la secuenciación de genes dirigidos, diseñados para ayudar a determinar la compatibilidad genética entre pacientes de trasplante y posibles donantes.

- AlloSeq Assign: Utilizado para ayudar en la asignación de un genotipo tras el enriquecimiento selectivo y la secuenciación utilizando los kits de reactivos AlloSeq Tx. El software Assign importa los datos de la secuencia, realiza la alineación de la secuencia, permite la edición de la secuencia y luego compara una secuencia de consenso con una librería de secuencias de alelos.

Forma de presentación: - AlloSeq Tx 17: ASTX17.1(24)-IVD y ASTX17.1(24)-B-IVD: hasta 24 muestras / ASTX17.1(96)-A-IVD y ASTX17.1(96)-B-IVD: hasta 96 muestras
- AlloSeq Tx 9: ASTX9.1(96)-A-IVD y ASTX9.1(96)-B-IVD: hasta 96 muestras
- AlloSeq Assign, software

Período de vida útil y condición de conservación: - Reactivos Caja 1 de 5, almacenar a -15 a -25 °C: Tagmentation Beads / Tagmentation Buffer / PCR Mix-1
- Reactivos Caja 2 de 5, almacenar a 15 a 30 °C: Stop Buffer / Tagmentation Wash Buffer
- Reactivos Caja 3 de 5, almacenar a -15 a -25 °C: Cebadores de indexación AlloSeq Tx
- Reactivos, caja 4 de 5, almacenar de -15 a -25 °C: AlloSeq Tx Probes / PCR Primers / Hybridisation Buffer 1 / Capture Wash Buffer / Capture Elution Buffer 1 / 2N NaOH / PCR Mix / PCR Mix-2
- Reactivos Caja 5 de 5, almacenar a 2-8 °C: Resuspension Buffer / Capture Beads / Hybridisation Buffer 2 / Capture Elution Buffer 2 / Purification Beads / Purification Beads-1 / Purification Beads -2
- AlloSeq Assign: no aplica

Nombre del fabricante:
CareDx Pty Ltd.

Lugar de elaboración:
220 Collie Street, Fremantle 6160, Western Australia - AUSTRALIA

Condición de uso: Uso profesional exclusivo

N° 1-0047-3110-002043-24-3

N° Identificadorio Trámite: 57591

AM



Instrucciones de uso

IFU095

Número de versión: 7.0

Fecha de edición: Enero de 2023

REF

ASTX17.1(24)-IVD

ASTX17.1(24)-B-IVD

ASTX17.1(96)-A-IVD

ASTX17.1(96)-B-IVD

ASTX9.1(96)-A-IVD

ASTX9.1(96)-B-IVD

IVD



CareDx Pty Ltd,
20 Collie Street,
Fremantle, WA 6160,
Australia



CareDx AB,
Franzégatan 5,
SE-112 51
Estocolmo, Suecia



Qarad BV,
Cipalstraat 3,
2440 Geel,
Bélgica



CareDx®

CareDx Pty Ltd

© 2020-2023 CareDx, Inc. Todas las marcas de servicio o las marcas comerciales son propiedad o se utilizan con licencia de CareDx, Inc. o sus filiales. Todos los derechos reservados.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Cecilia A. Arnaboldi".

CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Arnaboldi
M.P. 15533 • M.N. 13795
Dirección Técnica

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Oscar A. García".

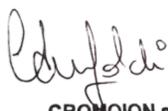
Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

Índice

1.	Descripción general	3
1.1	Principio	3
1.2	Uso previsto	3
1.3	Contenido genético dirigido de AlloSeq Tx	4
1.4	Contenido del kit AlloSeq Tx y requisitos de almacenamiento	4
1.5	Limitaciones y contraindicaciones	5
1.6	Requisitos de la muestra	6
1.7	Especificidad analítica / Sustancias interferentes	6
1.8	Características de rendimiento	8
1.9	Precisión	8
1.10	Especificidad	8
1.11	Reproducibilidad y repetibilidad	8
1.12	Supuestos	9
1.13	Seguridad	9
2.	Preparación de la librería (flujo de trabajo Early Pooling)	12
2.0	Introducción al protocolo	12
2.1	Preparación de la muestra	12
2.2	Preparación de la librería	12
2.3	Selección de tamaño y purificación	15
2.4	Cuantificación Qubit (opcional)	17
2.5	Visualización en TapeStation (opcional)	18
3.	Captura híbrida (flujo de trabajo Early Pooling)	20
3.0	Introducción al protocolo	20
3.1	Hibridación de sondas	20
3.2	Captura	21
3.3	PCR posterior al enriquecimiento	22
3.4	Purificación de PCR posterior al enriquecimiento	23
3.5	Cuantificación Qubit	24
3.6	Visualización en TapeStation (opcional)	25
4.	Preparación de la librería (flujo de trabajo Original)	26
4.0	Introducción al protocolo	26
4.1	Preparación de la muestra	26
4.2	Preparación de la librería	26
4.3	Selección de tamaño y purificación	29
4.4	Cuantificación Qubit (opcional)	31
4.5	Visualización en TapeStation (opcional)	32
5.	Captura híbrida (flujo de trabajo Original)	33
5.0	Introducción al protocolo	33
5.1	Agrupación de muestras	33
5.2	Concentración de pools de librerías (opcional)	33
5.3	Hibridación de sondas	34
5.4	Captura	36
5.5	PCR posterior al enriquecimiento	37
5.6	Purificación de PCR posterior al enriquecimiento	38
5.7	Cuantificación Qubit	39
5.8	Visualización en TapeStation (opcional)	39
6.	Secuenciación	41
6.0	Introducción al protocolo	41
6.1	Preparación de PhiX	41
6.2	Dilución y desnaturalización para MiSeq	42

Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

6.3 Dilución y desnaturalización para MiniSeq	43
6.4 Dilución para iSeq.....	44
7. Análisis de secuencias	45
8. Guía de solución de problemas.....	45
9. Información complementaria	46
Licencia	46
Insumos y equipo necesarios pero no suministrados	46
10. Información de contacto	49
11. Referencias	50



CROMOION s.r.l.
 Farm. Cecilia A. Amaboldi
 M.P. 15533 • M.N. 13795
 Dirección Técnica



Oscar A. Garcia
 Socio gerente
 Cromoion

1. Descripción general

1.1 Principio

AlloSeq Tx es el nombre de la familia de productos para la secuenciación de genes diana, diseñada para ayudar a determinar la compatibilidad genética entre pacientes de trasplante y posibles donantes. AlloSeq Tx aprovecha la tecnología de captura híbrida para enriquecer los genes de interés desde una preparación de librería genómica completa. El uso de la tecnología de captura híbrida, a diferencia de las técnicas tradicionales de “long-range PCR”, tiene ventajas en el flujo de trabajo y permite la flexibilidad del contenido variable de genes/secuencias sin necesidad de cambios en el flujo de trabajo.

A continuación se resume el principio del flujo de trabajo del ensayo AlloSeq Tx:

Etapa 1: Preparación de la librería: Fragmentación y tagmentación simultáneas del ADN, PCR de indexación, purificación y selección del tamaño,

Etapa 2: Captura híbrida (enriquecimiento): Sample pooling ¹ (flujo de trabajo original o flujo de trabajo de early pooling), hibridación de la sonda, captura de los fragmentos unidos a la sonda con beads magnéticos de estreptavidina, PCR de enriquecimiento final, purificación y cuantificación,

Etapa 3: Secuenciación: Dilución y desnaturalización y secuenciación en un secuenciador Illumina,

Etapa 4: Análisis: Genotipado en software AlloSeq Assign

¹ El flujo de trabajo de Early Pooling agrupa las muestras inmediatamente después de la indexación en un único tubo para todos los pasos posteriores, eliminando la selección de tamaño y la purificación basada en placas, así como el paso opcional de concentración. Este flujo de trabajo permite al usuario tomar muestras hasta la secuenciación en un solo turno de trabajo. Este flujo de trabajo es adecuado para los laboratorios que no utilizan automatización y prefieren un protocolo con menos tiempo de trabajo, menos uso de consumibles y un 46 % menos de pasos de pipeteo frente al flujo de trabajo original. El formato basado en placas del flujo de trabajo original es adecuado para laboratorios que optan por la automatización de este procedimiento.

Los kits AlloSeq Tx incluyen:

- Reactivos para preparar librerías genómicas completas,
- Sondas biotiniladas complementarias para capturar secuencias dianas, y
- Reactivos para enriquecer las dianas capturadas para la secuenciación.

Recomendamos a todos los usuarios que lean las instrucciones de uso completas, especialmente la sección *Seguridad*, antes de iniciar el procedimiento. Los procedimientos para el uso del software AlloSeq Assign se encuentran en las instrucciones de uso del software AlloSeq Assign.

1.2 Uso previsto

AlloSeq Tx es el nombre de la familia de productos para la secuenciación de genes dirigidos, diseñada para ayudar a determinar la compatibilidad genética entre pacientes de trasplante y posibles donantes; incluidas sondas para enriquecimiento selectivo de hasta 17 loci.

Los kits de tipaje AlloSeq Tx 17 son pruebas cualitativas para la tipaje de ADN de HLA-A, B, C, E, F, G, H, DRB1/3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1, MICA y MICB para ayudar en el cotejo genético para el trasplante de órganos o células madre.

CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Armaboldi
M.P. 15533 • M.N. 13795
Dirección Técnica

Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

Los kits de tipaje AlloSeq Tx 9 son pruebas cualitativas para el tipaje de ADN de HLA-A, B, C, DRB1/3/4/5, DQB1 y DPB1 para ayudar en el cotejo genético para el trasplante de órganos o células madre.

El producto está diseñado para su uso con los secuenciadores Illumina MiSeq, MiniSeq e iSeq, junto con el software de interpretación AlloSeq Assign.

El dispositivo está diseñado para ser utilizado por personal debidamente capacitado, con conocimiento de la frecuencia de los tipos de HLA en su población, en laboratorios debidamente regulados que realizan tipaje de tejidos (HLA) para donantes y receptores de trasplantes.

Los productos AlloSeq Tx son para uso profesional únicamente y no deben utilizarse como única base para tomar decisiones clínicas. Los kits AlloSeq Tx no se utilizan para el diagnóstico de enfermedades.

1.3 Contenido genético dirigido de AlloSeq Tx

Nombre del producto	Código de producto	Genes dirigidos	Tamaño del kit	Secuenciación ¹
AlloSeq Tx17	ASTX17.1(24)-IVD	HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -H, -DRB1/3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1, MICA y MICB	24 preparaciones de librería 4 enriquecimientos (entre 6 y 24 muestras por enriquecimiento)	≤24 muestras en MiSeq Micro flow cell ≤6 muestras en MiSeq Nano flow cell ≤24 muestras en iSeq ≤24 muestras en MiniSeq Mid Output flow cell
	ASTX17.1(24)-B-IVD			
	ASTX17.1(96)-A-IVD			
	ASTX17.1(96)-B-IVD			
AlloSeq Tx9	ASTX9.1(96)-A-IVD	HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 y -DPB1	96 preparaciones de librería 8 enriquecimientos (entre 12 y 96 muestras por enriquecimiento)	≤96 muestras en MiSeq Standard flow cell ≤24 muestras en MiSeq Micro flow cell ≤6 muestras en MiSeq Nano flow cell ≤24 muestras en iSeq ≤24 muestras en MiniSeq Mid Output flow cell
	ASTX9.1(96)-B-IVD			

¹ Los números de muestras y flow cells que aparecen en esta tabla se basan en la validación del kit AlloSeq Tx. Estas cifras pueden utilizarse a título indicativo y ser verificadas posteriormente por laboratorios individuales.

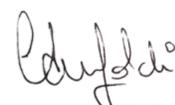
1.4 Contenido del kit AlloSeq Tx y requisitos de almacenamiento

Cuando se almacenan de acuerdo con las especificaciones de temperatura que se indican a continuación, los componentes del kit se pueden utilizar hasta la fecha de vencimiento indicada en los recipientes exteriores del kit, y pueden tolerar hasta 12 ciclos de congelación y descongelación. Después de su uso, los kits/componentes deben devolverse inmediatamente a condiciones de almacenamiento.

Los kits NO deben utilizarse después de su fecha de caducidad.

Reactivos Caja 1 de 5, almacenar a -15 a -25 °C.

Reactivo	Cantidad (24 pruebas)	Tamaño/tipo de tubo (24 pruebas)	Cantidad (96 pruebas)	Tamaño/tipo de tubo (96 pruebas)
Beads de tagmentación	1	0.5mL	1	1.5mL



CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Amaboldi
M.P. 15533 • M.N. 13795
Dirección Técnica



Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

Tampón de tagmentación	1	0.5mL	1	1.5mL
Mezcla-1 de PCR	N/D	N/D	1	5mL

Reactivos Caja 2 de 5, almacenar a 15 a 30 °C.

Reactivo	Cantidad (24 pruebas)	Tamaño/tipo de tubo (24 pruebas)	Cantidad (96 pruebas)	Tamaño/tipo de tubo (96 pruebas)
Tampón de parada	1	1.5mL	2	2mL
Tampón de lavado de tagmentación	2	5mL	1	50mL

Reactivos Caja 3 de 5, almacenar a -15 a -25 °C.

Reactivo	Cantidad (24 pruebas)	Tamaño/tipo de tubo (24 pruebas)	Cantidad (96 pruebas)	Tamaño/tipo de tubo (96 pruebas)
Cebadores de indexación AlloSeq Tx	1 juego (10 unidades)	Tubo FluidX	1 placa	Placa de 96 pocillos

Reactivos, caja 4 de 5, almacenar de -15 a -25 °C

Reactivo	Cantidad (24 pruebas)	Tamaño/tipo de tubo (24 pruebas)	Cantidad (96 pruebas)	Tamaño/tipo de tubo (96 pruebas)
Sondas AlloSeq Tx específicas para el producto	1	0.5mL	1	0.5mL
Mezcla de PCR	1	1.5mL	N/D	N/D
Mezcla-2 de PCR	N/D	N/D	1	0.5mL
Cebadores de PCR	1	0.5mL	1	0.5mL
Tampón de hibridación 1	1	1,5 mL, cónico	1	1,5 mL, Cónico
Tampón de lavado de captura	4	1,5 mL, ámbar cónico	8	1,5 mL, ámbar cónico
Tampón de elución de captura 1	1	0.5mL	1	0.5mL
2N NaOH	1	0.5mL	2	0.5mL

Reactivos Caja 5 de 5, almacenar a 2-8 °C

Reactivo	Cantidad (24 pruebas)	Tamaño/tipo de tubo (24 pruebas)	Cantidad (96 pruebas)	Tamaño/tipo de tubo (96 pruebas)
Purification Beads	1	5mL	N/D	N/D
Purification Beads-1	N/D	N/D	3	5mL
Purification Beads-2	N/D	N/D	1	0.5mL
Tampón de resuspensión	2	1.5mL	2	5mL
Capture Beads	1	1.5mL	1	5mL
Tampón de hibridación 2	1	0.5mL	1	0.5mL
Tampón de elución de captura 2	1	0.5mL	1	0.5mL

1.5 Limitaciones y contraindicaciones

- Se recomienda encarecidamente que el usuario valide estos kits antes de su implementación en el laboratorio utilizando muestras cuyo genotipo haya sido determinado por otros procedimientos basados en la estructura molecular.

- Se recomienda encarecidamente que el usuario siga todas las instrucciones proporcionadas en el etiquetado del producto. Las desviaciones respecto al procedimiento descrito no se recomiendan, pueden no ser soportadas y pueden provocar errores de tipaje.
- Se recomienda incluir un control positivo (ADN humano) y un control negativo (NTC) (con agua estéril en lugar de ADN) en cada ciclo de preparación de la librería. El control positivo debe producir una librería cuantificable (medida mediante Qubit o métricas de secuenciación de cobertura), y la secuencia resultante debe estar en concordancia con el genotipo esperado de la muestra. No debe haber una librería cuantificable (medida por Qubit o reportada como Cobertura Baja en Assign) en el control de plantilla negativo para cada experimento. Si se produce una librería cuantificable para el control negativo, la carrera debe repetirse.
- El ensayo AlloSeq Tx secuencia fragmentos de ADN con un tamaño promedio de 500 bp. Esto significa que los polimorfismos con una separación superior a 500 bp no pueden ser escalonados, lo que puede dar lugar a ambigüedades heterocigóticas.

1.6 Requisitos de la muestra

Tipo de muestra:

ADN genómico humano de alto peso molecular (suspendido en tampón Tris/EDTA y OD_{260/280} > 1,8) de muestras de sangre completa. NO utilice muestras de sangre entera que contengan heparina.

La cantidad recomendada de ADN genómico humano de alto peso molecular es de 100-1000 ng/μl. Las pruebas internas han demostrado que también se pueden utilizar muestras con cantidades de ADN de tan solo 50 ng. También se obtuvieron genotipos correctos a partir de ADN de mala calidad o fragmentado.

Estabilidad de la muestra:

Almacenamiento: La sangre completa debe recogerse en anticoagulantes ACD o EDTA. El ADN puede aislarse de las muestras hasta 2 semanas después de la extracción inicial de sangre, aunque se recomienda que las muestras se procesen en los 2 o 3 días siguientes a la extracción. Las muestras de sangre completa congelada pueden almacenarse entre -20 °C y -70 °C durante al menos 1 año sin que ello afecta a la calidad o la cantidad del ADN aislado. (Ref ASHI Laboratory Manual Vol 2).

Métodos de extracción de ADN:

El ensayo AlloSeq Tx se ha validado con el minikit QIAamp DNA Blood (nº de catálogo 51104), el kit EZ1 DNA Blood 350 μl (nº de catálogo 951054) y Promega Maxwell. Alternativamente, el ADN puede extraerse utilizando otros métodos y equipos validados por el usuario para aislar ADN de alto peso molecular.

1.7 Especificidad analítica / Sustancias interferentes

CareDx Pty Ltd ha identificado todas las sustancias potencialmente interferentes conocidas que podrían afectar el ensayo. Consulte la tabla siguiente.

Inhibidor	Fuente potencial	Riesgo	Comentarios
EDTA	Tampón TE, tubos de extracción de sangre	Muy bajo	Resuspenda el ADN en Tris-HCl pH8 o TE con <0,1 mM EDTA. Utilice kits comerciales de preparación de ADN sanguíneo. No resuspenda en EDTA > 0,1 mM.
Alcoholes	Etanol, isopropanol, alcohol isoamilo	Bajo	Asegúrese de secar al aire los pellets o los beads de ADN e inspeccionar visualmente en busca de gotas de etanol (1 % de etanol = 1,25 ul 80 % de etanol en una reacción PCR de 100 ul). Hay múltiples pasos de lavado con etanol al 80 % en el protocolo AlloSeqTx, lo que implica que la inhibición debida al arrastre de etanol sea un riesgo bajo, pero ligeramente más alto que otros factores.

Inhibidor	Fuente potencial	Riesgo	Comentarios
Exceso de sales	KCl, NaCl, CsCl, NAAC	Muy bajo	Asegúrese de lavar a fondo los pellets o los beads de ADN con etanol al 80 %. Asegúrese de que el OD 260/230 para iniciar el ADN genómico es ~2
Sales caotrópicas	Guanidinio Cl; MgCl ₂ ; urea	Muy bajo	Asegúrese de lavar a fondo los pellets o los beads de ADN con etanol al 80 %. Asegúrese de que el OD 260/230 para iniciar el ADN genómico es ~2
Fenol: cloroformo	Arrastre orgánico	Muy bajo	Un componente del procedimiento comercial de extracción de ADN Trizol ampliamente utilizado. Asegúrese de lavar a fondo los pellets o los beads de ADN con etanol al 80 %. Asegúrese de que el OD 260/230 para iniciar el ADN genómico es ~2
Proteínas	BSA, PEG, albúmina sanguínea	Muy bajo	Utilice kits comerciales de preparación de ADN sanguíneo. Asegúrese de que el OD 260/280 para iniciar el ADN genómico es > 1,8
Heme, hemoglobina, inmunoglobulinas	Sangre	Muy bajo	Evite el uso de muestras de sangre que presenten hemólisis intensa. Utilice kits comerciales de preparación de ADN sanguíneo. Asegúrese de que el OD 260/280 para iniciar el ADN genómico es > 1,8
Detergentes/DDT	Na deoxicolato, sarkosyl, SDS, NP40, Tween 20, Triton X-100, N-octil glucósido	Muy bajo	Asegúrese de lavar a fondo los pellets o los beads de ADN con etanol al 80 %. Asegúrese de que el OD 260/230 para iniciar el ADN genómico es ~ 2
Proteasas	Proteinasas K, manipulación de muestras	Muy bajo	Utilice kits comerciales de preparación de ADN sanguíneo o saliva. Use guantes en todo momento
Nucleasas	Manipulación de muestras, enzimas de restricción, nucleasa microcócica	Muy bajo	Utilice kits comerciales de preparación de ADN sanguíneo. Use guantes en todo momento
ADN/ARN exógeno	Arrastre, contaminación	Muy bajo	Prepare ADN genómico en un área específica pre-PCR
Transportadores	ARN, heparina, glucógeno	Muy bajo	Use kits comerciales de preparación de ADN sanguíneo y/o evite los tubos de extracción de sangre con heparina
Exceso de iones metálicos	Mg ²⁺ de tampón PCR, iones de Fe	Muy bajo	Asegúrese de lavar a fondo los pellets o los beads de ADN con etanol al 80 %. Asegúrese de que el OD 260/230 para iniciar el ADN genómico es ~ 2
Medicamentos antivirales (por ejemplo, aciclovir)	Sangre	Muy bajo	Utilice kits comerciales de preparación de ADN sanguíneo. Asegúrese de que el OD 260/280 para iniciar el ADN genómico es > 1,8
Polvo de guante	Guantes empolvados	Muy bajo	Use guantes sin polvo
Tubos de PCR irradiados por UV	Tratamiento UV de tubos de PCR	Muy bajo	Evite el tratamiento UV de los productos de plástico

Inhibidor	Fuente potencial	Riesgo	Comentarios
Biotina	De productos farmacéuticos que interactúan con la estreptavidina	Muy bajo	Existen numerosos lavados de purificación entre la recogida de muestras y el paso de captura híbrida dentro del protocolo que permitirán la eliminación de las moléculas de biotina. En el caso de un ensayo de captura híbrido, la presencia de biotina (que como se ha descrito anteriormente es poco probable) no dará lugar a un resultado erróneo. Podría causar una reducción de la eficiencia de enriquecimiento que se detectaría como un bajo rendimiento de enriquecimiento o bien no dar ningún resultado.

1.8 Características de rendimiento

El rendimiento del ensayo se evaluó mediante un panel de muestras de ADN con genotipos conocidos, incluidas muestras de control internas de CareDx, normas de referencia de HLA de talleres de histocompatibilidad internacionales (IHW) y muestras obtenidas del Intercambio de ADN de HLA Internacional de la Universidad de California, Los Ángeles (UCLA). Se evaluó el rendimiento de preparación, enriquecimiento y secuenciación de la librería con arreglo a criterios de aceptación definidos.

1.9 Precisión

El producto AlloSeq Tx junto con el software AlloSeq Assign están diseñados para cumplir con la norma ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics) y con la norma EFI (European Federation of Immunogenetics) para el tipaje HLA.

Resumen del resultado obtenido de los estudios de verificación y validación:

MÉTRICA	PANEL	TAMAÑO DEL PANEL (n)	RESULTADO
Concordancia de genotipado	Interna	190	100 %
Concordancia de genotipado	UCLA	24	98,12 %
Concordancia de genotipado	IHW	48	98,06 %
Concordancia de genotipado	Externa	124	99,54 %
Total/Concordancia general			99,49%

En todos los casos de discordancia observados en los estudios de verificación/validación, se cree que la discordancia surge de las limitaciones del método o tecnología de tipaje anterior.

1.10 Especificidad

Los datos han demostrado que una especificidad tan baja como el 12 % no influye en el ensayo, mientras que los valores típicos de especificidad caen en el rango de 64 y 92 %. La especificidad completa es poco probable y sería un indicador de posibles problemas de calidad. Aunque la estrategia de diseño de la sonda hace que la probabilidad de que falten alelos sea improbable, es probable que el paradigma de sensibilidad frente a especificidad sea verdadero. Es decir, un cierto grado de especificidad reducida garantizará una sensibilidad completa y los alelos, incluidos los nuevos alelos, se secuenciarán con éxito.

1.11 Reproducibilidad y repetibilidad

Se ha demostrado que el producto AlloSeq Tx junto con el software AlloSeq Assign proporciona resultados equivalentes en lotes en un estudio de verificación de lote a lote y en laboratorios, usuarios e instrumentos que se han probado en

verificación y validación en cuatro centros externos. Se ha comprobado que el producto AlloSeq Tx proporciona resultados equivalentes para la misma muestra en series repetidas.

1.12 Supuestos

- Los instrumentos están correctamente calibrados y bajo un plan de mantenimiento según sea necesario.
- Los procedimientos operativos estándar (SOP) están establecidos y controlados.
- El kit lo utiliza personal de laboratorio cualificado y autorizado
- Los reactivos se utilizan dentro de las fechas de vencimiento indicadas.
- Los reactivos de diferentes lotes de kits NO se utilizan juntos. Esto puede afectar al rendimiento del kit.
- Solo se utilizan los reactivos registrados como no incluidos pero necesarios en este documento.
- Se debe tener cuidado para evitar la contaminación cruzada de las muestras de ADN o mezcla de muestras
- Se debe tener cuidado en todas las etapas para evitar salpicaduras
- Los libros de trabajo suministrados por el fabricante se utilizan conjuntamente con este documento

1.13 Seguridad

Siga las prácticas generales de seguridad del laboratorio y las prácticas de prevención de la contaminación en salas limpias al realizar este procedimiento. A través del proceso de gestión de riesgos de CareDx Pty Ltd, todos los riesgos se han mitigado hasta un límite aceptable. Se deben seguir las instrucciones de uso evitar situaciones de uso peligroso. Este kit contiene materiales peligrosos. Consulte las hojas de datos de seguridad y tome todas las precauciones necesarias en la manipulación y eliminación.

COMPONENTE DEL KIT	PICTOGRAMAS	ADVERTENCIA DE SEGURIDAD
<p>TAMPÓN DE TAGMENTACIÓN Contiene N,N-dimetilformamida</p>		<p>Palabra de señal: Peligro</p> <p>Declaraciones de peligro: H319 - Causa irritación ocular grave H332 - Nocivo por inhalación H350 - Puede causar cáncer H360 - Puede dañar la fertilidad o al feto</p> <p>Declaraciones de precaución - UE (§28, 1272/2008) P201 - Obtener instrucciones especiales antes de su uso P202 - No manipular hasta que se hayan leído y entendido todas las precauciones de seguridad P261 - Evitar respirar polvo/humo/gas/niebla/vapores/aerosol P270 - No comer, beber ni fumar cuando se está manipulando el producto P280 - Utilizar guantes protectores/ropa protectora/protección ocular/protección facial P264 - Lavarse bien la cara, las manos y toda la piel expuesta después de la manipulación P272 - No debe permitirse sacar ropa de trabajo contaminada fuera del lugar de trabajo P308 + P313 - EN CASO DE EXPOSICIÓN MANIFIESTA O PRESUNTA: Solicitar asistencia/atención médica P304 + P340 - EN CASO DE INHALACIÓN: Sacar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición cómoda para respirar P313 - Solicitar asistencia/atención médica P305 + P351 + P338 - EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Lavar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitarse las lentes de contacto, si se puede hacer fácilmente. Continuar con el lavado P337 + P313 - SI PERSISTE LA IRRITACIÓN OCULAR: Solicitar asistencia/atención médica P405 - Almacenar bajo llave P501 - Eliminar el contenido/recipiente en una planta de eliminación de residuos aprobada</p>

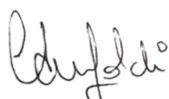

 Oscar A. García
 Socio gerente
 Cromoion

COMPONENTE DEL KIT	PICTOGRAMAS	ADVERTENCIA DE SEGURIDAD
<p>MEZCLA DE PCR Contiene cloruro de tetrametilamonio</p>		<p>Palabra de señal: Peligro</p> <p>Declaraciones de peligro H302 - Nocivo por inhalación H371 - Puede causar daños en los órganos H412 - Nocivo para la vida acuática con efectos duraderos</p> <p>Declaraciones de precaución - UE (§28, 1272/2008) P260 - No respirar polvo/humo/gas/niebla/vapores/aerosol P270 - No comer, beber ni fumar cuando se está manipulando el producto P280 - Utilizar guantes protectores/ropa protectora/protección ocular/protección facial P264 - Lavarse bien la cara, las manos y toda la piel expuesta después de la manipulación P272 - No debe permitirse sacar ropa de trabajo contaminada fuera del lugar de trabajo P273 - Evitar la liberación al medio ambiente P308 + P313 - EN CASO DE EXPOSICIÓN MANIFIESTA O PRESUNTA: Solicitar asistencia/atención médica P301 + P312 - EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico si se siente mal P330 - Enjuagar la boca P405 - Almacenar bajo llave P501 - Eliminar el contenido/recipiente en una planta de eliminación de residuos aprobada</p>
<p>2N NaOH Contiene hidróxido de sodio</p>		<p>Palabra de señal: Peligro</p> <p>Declaraciones de peligro H314 - Causa quemaduras graves en la piel y daños en los ojos H318 - Causa daños oculares graves</p> <p>Declaraciones de precaución - UE (§28, 1272/2008) P260 - No respirar polvo/humo/gas/niebla/vapores/aerosol P264 - Lavarse bien la cara, las manos y toda la piel expuesta después de la manipulación P280 - Utilizar guantes protectores/ropa protectora/protección ocular/protección facial P301 + P330 + P331 - EN CASO DE INGESTIÓN: enjuagarse la boca. NO inducir el vómito P303 + P361 + P353 - EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el cabello): Quitarse la ropa contaminada inmediatamente. Lavar la piel con agua/ ducharse P363 - Lavar la ropa contaminada antes de volver a usarla P310 - Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico P304 + P340 - EN CASO DE INHALACIÓN: Sacar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición cómoda para respirar P305 + P351 + P338 - EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Lavar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitarse las lentes de contacto, si se puede hacer fácilmente. Continuar con el lavado P405 - Almacenar bajo llave P501 - Eliminar el contenido/recipiente de acuerdo con las regulaciones locales, regionales, nacionales e internacionales según corresponda</p>
<p>CAPTURE BEADS Contiene formamida</p>		<p>Palabra de señal: Peligro</p> <p>Declaraciones de peligro H351 - Se sospecha que causa cáncer H360 - Pueden dañar la fertilidad o al feto H373 - Pueden provocar daños en los órganos por exposición prolongada o repetida</p> <p>Declaraciones de precaución - UE (§28, 1272/2008) P201 - Obtener instrucciones especiales antes de su uso P202 - No manipular hasta que se hayan leído y entendido todas las precauciones de seguridad P260 - No respirar polvo/humo/gas/niebla/vapores/aerosol</p>

COMPONENTE DEL KIT	PICTOGRAMAS	ADVERTENCIA DE SEGURIDAD
		<p>P270 - No comer, beber ni fumar cuando se está manipulando el producto</p> <p>P280 - Utilizar guantes protectores/ropa protectora/protección ocular/protección facial</p> <p>P264 - Lavarse bien la cara, las manos y toda la piel expuesta después de la manipulación</p> <p>P272 - No debe permitirse sacar ropa de trabajo contaminada fuera del lugar de trabajo</p> <p>P308 + P313 - EN CASO DE EXPOSICIÓN MANIFIESTA O PRESUNTA: Solicitar asistencia/atención médica</p> <p>P405 - Almacenar bajo llave</p> <p>P501 - Eliminar el contenido/recipiente en una planta de eliminación de residuos aprobada</p>
<p>TAMPÓN DE HIBRIDACIÓN 1 Contiene formamida</p>		<p>Palabra de señal: Peligro</p> <p>Declaraciones de peligro H351 - Se sospecha que causa cáncer H360 - Puede dañar la fertilidad o al feto</p> <p>Declaraciones de precaución - UE (§28, 1272/2008) P201 - Obtener instrucciones especiales antes de su uso P202 - No manipular hasta que se hayan leído y entendido todas las precauciones de seguridad P261 - Evitar respirar polvo/humo/gas/niebla/vapores/aerosol P270 - No comer, beber ni fumar cuando se está manipulando el producto P280 - Utilizar guantes protectores/ropa protectora/protección ocular/protección facial P264 - Lavarse bien la cara, las manos y toda la piel expuesta después de la manipulación P272 - No debe permitirse sacar ropa de trabajo contaminada fuera del lugar de trabajo P308 + P313 - EN CASO DE EXPOSICIÓN MANIFIESTA O PRESUNTA: Solicitar asistencia/atención médica P405 - Almacenar bajo llave P501 - Eliminar el contenido/recipiente en una planta de eliminación de residuos aprobada</p>
<p>TAMPÓN DE PARADA Contiene dodecil sulfato de sodio</p>		<p>Palabra de señal: Advertencia</p> <p>Declaraciones de peligro H319 - Causa irritación ocular grave</p> <p>Declaraciones de precaución - UE (§28, 1272/2008) P264 - Lavarse bien la cara, las manos y toda la piel expuesta después de la manipulación P280 - Utilizar guantes protectores/ropa protectora/protección ocular/protección facial P305 + P351 + P338 - EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Lavar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitarse las lentes de contacto, si se puede hacer fácilmente. Continuar con el lavado. P337 + P313 - SI PERSISTE LA IRRITACIÓN OCULAR: Solicitar asistencia/atención médica</p>

NOTA: El componente 'Beads de purificación' contiene azida sódica (<0,1 %) que no se considera una concentración peligrosa de acuerdo con EC 1272/2008 (CLP/GHS), las Directivas 1999/45/CE y 67/548/CEE o US-OSHA (HCS 29 CFR 1910.1200) y UN GHS.

Para obtener más información sobre todos los materiales peligrosos incluidos en el kit AlloSeq Tx, consulte la hoja de datos de seguridad TEC478_AlloSeq Tx en www.caredx.com.


CROMOION s.r.l.
 Farm. Cecilia A. Arnaboldi
 M.P. 15533 - M.N. 13795
 Dirección Técnica


 Oscar A. García
 Socio gerente
 Cromoion

2. Preparación de la librería (flujo de trabajo Early Pooling)

2.0 Introducción al protocolo

- Siga el protocolo AlloSeq Tx a continuación en el orden que se muestra y utilizando los parámetros especificados.
- Antes de continuar, confirme el contenido del kit y asegúrese de que dispone de los insumos y el equipo necesarios.
- Para facilitar su uso, los pasos del protocolo para la preparación de la librería también se detallan en *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD*. Las referencias al cuaderno de trabajo del Capítulo 2 pertenecen a este cuaderno.

2.1 Preparación de la muestra

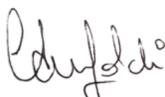
1. Introduzca el ID del experimento, la descripción, el operador y la fecha en el cuaderno de trabajo.
2. Seleccione el conjunto de sondas AlloSeq que se va a utilizar para el experimento en el menú desplegable del cuaderno de trabajo.
3. Seleccione el tipo de secuenciador que se va a utilizar en el menú desplegable del cuaderno. Una vez seleccionado el tipo de secuenciador, las instrucciones de secuenciación aparecerán en el cuaderno de trabajo.
4. Introduzca el ID de las muestras que se van a probar en la sección amarilla del diseño de placa del cuaderno de trabajo, según la configuración deseada.

NOTA: Solamente se pueden introducir caracteres alfanuméricos. Los ID de muestra duplicados se señalarán en rojo para pedir al usuario que los corrija. Es un requisito del software del secuenciador tener solamente ID de muestra únicos en una carrera. No introduzca ninguna información para los pocillos que no estén destinados a contener ninguna muestra.

5. Seleccione el conjunto de índices deseado de la lista desplegable naranja bajo Diseño de la placa.
6. Si es necesario, y utilizando el formato de índice de tubos, el orden del índice i7 puede modificarse. Seleccione el índice i7 alternativo que va a utilizar en la lista desplegable de opciones para la columna requerida. Si se seleccionan índices i7 duplicados, las celdas se señalarán en rojo para pedir al usuario que las corrija.
7. Si es necesario, y utilizando el formato de índice de tubos, el orden del índice i7 puede modificarse. Seleccione el índice i7 alternativo que va a utilizar en la lista desplegable Opciones para la columna requerida. Si se seleccionan índices i5 duplicados, las celdas se señalarán en rojo para pedir al usuario que las corrija.
8. Una vez completadas todas las acciones anteriores, haga clic en la pestaña 1.2 SampleSheet y revise. Se utilizará texto en rojo para señalar los lugares donde todavía se necesita información. Si no hay texto en rojo, la pestaña SampleSheet puede guardarse como un archivo CSV (delimitado por comas) (*.csv). Guarde el archivo como "SampleSheet.csv". Al guardar en formato CSV, solamente se guardará la pestaña activa. Abra el archivo SampleSheet.csv guardado en Excel y elimine las filas vacías de la tabla [Datos], es decir, las filas entre 22 y 117 que no contengan información sobre la muestra. Cuando haya terminado, guarde el archivo. La hoja de muestras estará lista y podrá importarse para la secuenciación en un secuenciador de Illumina.

2.2 Preparación de la librería

1. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:



CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Amaboldi
M.P. 15533 • M.N. 13795
Dirección Técnica



Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por muestra (µL)	Preparación necesaria
Tampón de tagmentación	-15 °C a -25 °C CAJA 1	10	Póngalo a temperatura ambiente.
Agua estéril	15 °C a 30 °C. Suministrada por el usuario	30	No necesita preparación.
Beads de tagmentación	-15 °C a -25 °C CAJA 1	10	Póngalos a temperatura ambiente al menos 30 minutos.
Tampón de parada	15 °C a 30 °C CAJA 2	10	No necesita preparación.
Tampón de lavado de tagmentación	15 °C a 30 °C CAJA 2	300	No necesita preparación.
PCR Mix (o PCR Mix-1 si se utilizan kits de 96 muestras)	-15 °C a -25 °C CAJA 4 (o Caja 1 para PCR Mix-1)	20	Descongele y manténgalos en hielo. Tras el uso, devuélvalos a almacenamiento para pasos posteriores.
Índices: ASTX17.1(24)-IVD: H503, H505, H506, H517, H705, H706, H707, H710, H711, H714 ASTX17.1(24)-B-IVD: H502, H507, H508, H521, H701, H702, H703, H704, H712, H715 ASTX17.1(96)-A-IVD/ASTX9.1(96)-A-IVD: H503, H505, H506, H517, H502, H507, H508, H521, H705, H706, H707, H710, H711, H714, H701, H702, H703, H704, H712, H715 ASTX17.1(96)-B-IVD/ASTX9.1(96)-B-IVD: H510, H511, H513, H522, H515, H516, H518, H520, H716, H718, H719, H720, H721, H722, H723, H724, H726, H727, H728, H729	-15 °C a -25 °C CAJA 3	10 total	Descongele y manténgalos en hielo.

- Agite y realice un pulso de centrifuga de todos los reactivos antes de usarlos.
- Reúna la placa con esquina cortada de 96 pocillos necesaria, el Microseal B y los tubos de microcentrifugación de 1,5 ml.

NOTA: No hay un punto de parada seguro hasta la PCR de indexación. El proceso dura aproximadamente **1:50** horas (incluidos 50 minutos de termociclaje de PCR).

- Para cada muestra de ADN, introduzca alícuotas de 10 µL de muestra de 10-100 ng/µL en el pocillo adecuado de una placa de PCR según el diseño de la placa en la hoja 1.0 Sample_Prep.
- Prepare 40 µL de mezcla maestra de tagmentación por muestra usando; 10 µL de tampón de tagmentación, 20 µL de agua estéril y 10 µL de beads de tagmentación.
- Mezcle la mezcla maestra anterior con un agitador vortex y, a continuación, realice un pulso de centrifuga.
- Pipetee 40 µL de la mezcla maestra de tagmentación en cada pocillo que contenga una muestra de ADN.
- Selle la placa con film Microseal B.
- Haga un pulso de centrifuga de la placa a 100 x g durante 10 segundos para recoger todos los reactivos del fondo del pocillo.

10. Utilice el agitador de placas para mezclar a 1800 r/min durante 1 minuto.
11. Inspeccione visualmente la placa:
 - a) Si los beads no están distribuidos uniformemente en el pocillo, repita el agitado según el paso 10,
 - b) Si el material no está en el fondo del pozo o ha salpicado en el film Microseal B, realice un pulso de centrifuga y repita el paso de agitado 10.
12. Coloque la placa en el termociclador y ejecute el programa de Tagmentación con la tapa calentada a 105 °C, y el volumen de reacción 50 µL:

Temperatura	Tiempo
55°C	5 minutos
10°C	2 minutos

13. Una vez finalizado el programa, retire inmediatamente la placa del termociclador y déjela a temperatura ambiente durante 2 minutos.
14. Retire el film Microseal B.
15. Añada 10 µl de Stop Buffer a cada pocillo de reacción.
16. Vuelva a sellar la placa con film Microseal B.
17. Utilice el agitador de placas para mezclar a 1800 r/min durante 1 minuto.
18. Incube la placa durante 5 minutos adicionales a temperatura ambiente.
19. Durante la incubación, retire el PCR Mix (o PCR Mix-1, si está utilizando kits de 96 muestras) y los índices del congelador para descongelarlos y, a continuación, colóquelos sobre hielo/gradilla fría.
20. Inspeccione visualmente la placa. Si el material no está en la parte inferior del pocillo o se ha salpicado sobre el film Microseal B, gire y agite la placa.
21. Lave tres veces con tampón de lavado de tagmentación como se describe a continuación:
 - a) Retire el Microseal B y coloque la placa en el soporte magnético-96 durante 30 segundos, permitiendo que los beads se acumulen en los pocillos junto al imán.
 - b) Con una pipeta, aspire y deseche el sobrenadante, dejando los beads en los pocillos junto al imán,
 - c) Añada lentamente 100 µL de tampón de lavado de la tagmentación a cada pocillo,
 - d) Vuelva a sellar la placa con nuevo film Microseal B; asegúrese de que el film está correctamente fijado,
 - e) Utilice el agitador de placas para mezclar a 1800 r/min durante 2 minutos a temperatura ambiente,
 - f) **PRECAUCIÓN:** Si las muestras han salpicado en el sello, centrifugar a 100 x g durante 10 segundos antes de retirar el sello,
 - g) Repita los pasos a) a f) dos veces más para un total de 3 lavados.

NOTA: Antes de desechar el sobrenadante del tercer lavado, prepare la mezcla maestra de PCR como se describe a continuación.

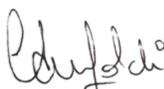
22. Prepare una mezcla maestra de PCR de 40 µL usando 20 µL de agua estéril y una mezcla de PCR de 20 µL. (o Mezcla-1 de PCR si se utilizan kits de 96 muestras).

NOTA: La mezcla de PCR se utiliza para posteriores pasos del protocolo. No deseche este tubo.

23. Retire el Microseal B y coloque la placa en el soporte magnético-96 durante 30 segundos, permitiendo que los beads se acumulen en los pocillos junto al imán.
24. Con una pipeta ajustada a 100 µl, aspire y deseche el sobrenadante del lavado de tagmentación final.
25. Retire la placa del soporte magnético.
26. Añada 40 µL de la mezcla maestra de PCR a cada pocillo.
27. Selle la placa con film Microseal B.
28. Utilice el agitador de placas para mezclar a 1800 r/min durante 2 minutos a temperatura ambiente.
29. Haga un pulso de centrifuga de la placa a 100 x g durante 10 segundos para asegurarse de que todos los beads estén suspendidos dentro de la mezcla maestra de PCR.

Para tubos de indexación (T),


Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion


CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Amaboldi
M.P. 15533 • M.N. 13795
Dirección Técnica

30. (T) Agite y haga un pulso por centrifuga de los tubos de indexación para garantizar que todo el volumen se encuentre en la parte inferior del tubo.
 31. (T) Retire el film Microseal B de la placa de muestras.
 32. (T) Añada 5 µL del índice i7 a cada pocillo, de acuerdo con el diseño de la placa en la hoja 1.0 Sample_Prep.
 33. (T) Añada 5 µL del índice i5 a cada pocillo, de acuerdo con el diseño de la placa en la hoja 1.0 Sample_Prep.
- Vaya al paso 34.

Para placa de indexación (P),

30. (P) Utilice el agitador de placas para mezclar la placa de indexación a 1800 r/min durante 1 minuto.
 31. (P) Centrifugue la placa de indexación a 100 x g durante 10 segundos para recoger todos los reactivos del fondo del pocillo.
 32. (P) Retire el film Microseal B de la placa de muestras.
 33. (P) Confirme que la orientación de la placa y el conjunto de índices sean correctos. **No despegue el sello de film.** Perfore el sello de film de la placa de indexación con una punta. Con una punta nueva, transfiera 10 µL de los índices combinados de la placa de indexación a cada pocillo de muestra, según la disposición de la placa en la hoja 1.0 Sample_Prep.
- Vaya al paso 34.
34. Vuelva a sellar con film Microseal B nuevo.
 35. Utilice el agitador de placas para mezclar a 1800 r/min durante 1 minuto a temperatura ambiente.
 36. Haga un pulso de centrifuga de la placa a 100 x g durante 10 segundos para recoger todos los reactivos del fondo del pocillo. Realice una inspección visual para asegurarse de que los beads siguen distribuyéndose uniformemente en la solución. Si los beads no están distribuidos uniformemente, repita el agitado según el paso 35.
 37. Coloque la placa en el termociclador y ejecute el programa de PCR de indexación con la tapa calentada a 105 °C y un volumen de reacción de 50 µl:

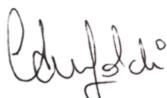
N.º	Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
1	Gap fill	72°C	3 minutos	1
2	Desnaturalización inicial	98°C	3 minutos	1
3	Desnaturalización	98°C	20 segundos	9
4	Annealing	60°C	30 segundos	
5	Extensión	72°C	3 minutos	
6	Extensión final	72°C	3 minutos	1
7	Retención final	10°C	Retención	1

NOTA: Punto de parada seguro. Las librerías pueden almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 1 semana.

NOTA: Si procede inmediatamente a la selección del tamaño y la purificación, asegúrese de que los beads de purificación se pongan a temperatura ambiente antes de su uso.

2.3 Selección de tamaño y purificación

1. Para obtener un rendimiento y una selección de tamaño óptimos, el volumen de la muestra, los beads y el sobrenadante varían en función del tamaño de la ejecución. En la tabla siguiente se muestran los volúmenes analizados para el intervalo de muestras especificado por ejecución.



CROMOION s.r.l.
 Farm. Cecilia A. Amaboldi
 M.P. 15533 - M.N. 13795
 Dirección Técnica



Oscar A. García
 Socio gerente
 Cromoion

Volúmenes de reactivo para cálculos	6-24 Muestras/Pool	25-48 Muestras/Pool	49-96 Muestras/Pool
N.º de muestras que se van a agrupar (máx. mostrado para intervalos)	24	48	96
Volumen de la librería que se va a agrupar por muestra (µL)	10	5	2.5
Volumen de beads diluidos por muestra (µL)	50	25	12.5
Volumen de transferencia de sobrenadante por muestra (µL)	55	27.5	13.75
Volumen de beads limpios por muestra, paso 8 (µL)	4.4	2.2	1.1

2. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por muestra (µL)	Preparación necesaria
Beads de purificación (Beads de purificación-1 para kits de 96 muestras)	2°C a 8°C CAJA 5	24.7	Póngalos a temperatura ambiente al menos 30 minutos. Tras el uso, devuélvalos a almacenamiento para pasos posteriores.
Agua estéril	15 °C a 30 °C. Suministrada por el usuario	Variado	No necesita preparación.
Etanol al 100 %	15 °C a 30 °C. Suministrada por el usuario	1920	Prepare etanol al 80 % como se describe a continuación.
Tampón de resuspensión	2°C a 8°C. CAJA 5	Variado	Póngalo a temperatura ambiente. Tras el uso, devuélvalos a almacenamiento para pasos posteriores.

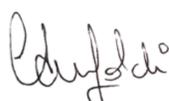
- Prepare beads de purificación diluidos con beads de purificación y agua estéril utilizando los volúmenes calculados según *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD*. Asegúrese de la correcta agitación de los beads de purificación antes del uso.
- Prepare 2400 µL de etanol al 80 % fresco por pool, suficiente para 2 lavados, utilizando 1920 µL de etanol al 100 % y 480 µL de agua estéril.

NOTA: El número de pools por experimento está preestablecido en 1 en la celda amarilla del paso 3 del cuaderno de trabajo. Puede anularse manualmente en caso de ser necesario. La modificación de esta celda actualizará el número de pools para posteriores pasos de este protocolo/cuaderno de trabajo. Si se va a realizar más de un pool en este experimento con el mismo número de muestras por pool, el volumen de beads de purificación debe aumentarse en consecuencia (es decir, duplicarse para dos pools), y deben seguirse las instrucciones siguientes en su totalidad para cada pool.

Si se necesitan varios pools con diferente número de muestras, esta pestaña del cuaderno de trabajo debe duplicarse y las celdas en amarillo deben actualizarse para reflejar el número de muestras, de modo que los volúmenes de reactivo necesarios/transferidos se ajusten correctamente. Para duplicar la pestaña, haga clic con el botón derecho en cualquiera de las pestañas y seleccione "Mover o copiar", seleccione "3.0 SS_Purificación" de la lista, marque la casilla "Crear copia" y haga clic en "Aceptar".

- Agite y realice un pulso de centrifugación de todos los reactivos antes de usarlos.
- Reúna tubos de 1,5 mL (**Opcional:** si así lo prefiere, se pueden usar tubos de 2 ml, con incremento del volumen de lavado de etanol de 1200 µl a 1500 µl en el paso 20a más adelante).

NOTA: El proceso tarda aproximadamente 1 hora.



GROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Amaboldi
M.P. 15533 - M.N. 13795
Dirección Técnica



Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

Para uso de diagnóstico *in-vitro*

7. Distribuya el volumen adecuado (ver la tabla de cálculos anterior o el cuaderno de trabajo) de Purification Beads diluidas en el tubo de 1,5 mL.
8. Pipetee la mezcla de Tagmentation beads y el sobrenadante del PCR de indexación **o bien** agite la placa del PCR de indexación durante 1 minuto a 1800 r/min y, a continuación, añada el volumen adecuado de cada mezcla (ver la tabla de cálculos anterior o el cuaderno de trabajo) al tubo que contiene Purification Beads diluidos.
9. Agite cada uno de los tubos a alta velocidad durante 10 segundos hasta que la muestra tenga un aspecto visualmente homogéneo.
10. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos. Durante esta incubación los fragmentos más grandes se unen a los beads.
11. Haga un pulso de centrifuga rápido del tubo.
12. Coloque el tubo en un imán durante 2,5 minutos, permitiendo que los beads se acumulen junto al imán. Si el sobrenadante se mantiene turbio, déjelo en el imán hasta que se aclare.
13. **Transfiera** el volumen apropiado (ver la tabla de cálculos anterior o el cuaderno de trabajo) del sobrenadante al nuevo tubo.
14. Añada el volumen adecuado (ver la tabla de cálculos anterior o el cuaderno de trabajo) de Purification Beads (sin diluir) al tubo que contiene el sobrenadante.
15. Agite cada tubo a alta velocidad durante 10 segundos.
16. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos. Durante esta incubación, los fragmentos de tamaño objetivo se unen a los beads.
17. Haga un pulso de centrifuga rápido del tubo.
18. Coloque el tubo en un imán durante 2,5 minutos, permitiendo que los beads se acumulen junto al imán. Si el sobrenadante se mantiene turbio, déjelo en el imán hasta que se aclare.
19. Con una pipeta, aspire y deseche el sobrenadante, dejando los beads en el tubo junto al imán.
20. Manteniendo el tubo en el imán, lave dos veces con etanol al 80 %:
 - a) Añada 1200 µl de etanol al 80 % a cada tubo,
 - b) Incube a temperatura ambiente durante 30 segundos,
 - c) Con una pipeta, aspire y deseche todo el sobrenadante,
 - d) Repita los pasos a) a c) para un total de 2 lavados.
21. Retire todo el sobrenadante restante con la pipeta P20.
22. Seque el tubo al aire durante 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir que el etanol residual se evapore.
23. Saque el tubo del imán y añada 37 µl de Resuspension Buffer a cada tubo para eluir los fragmentos objetivo.
24. Agite cada tubo a alta velocidad durante 10 segundos.
25. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
26. Haga un pulso de centrifuga rápido del tubo.
27. Coloque el tubo sobre un imán durante 30 segundos, permitiendo que los beads se acumulen junto al imán.
28. Transfiera 35 µl de sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml para su almacenamiento. Este pool puede continuar hasta la hibridación.

NOTA: Punto de parada seguro. Las librerías pueden almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 1 mes.

2.4 Cuantificación Qubit (opcional)

1. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por pool (µL)	Preparación necesaria
Tampón Qubit BR	-25 °C a 30 °C Suministrado por el usuario	199	No necesita preparación.

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por pool (µL)	Preparación necesaria
Tinte Qubit BR	-25 °C a 30 °C Suministrado por el usuario	1	No necesita preparación.
Estándar BR n.º 1	2 °C a 8 °C Suministrado por el usuario	10	Póngalo a temperatura ambiente.
Estándar BR n.º 2	2 °C a 8 °C Suministrado por el usuario	10	Póngalo a temperatura ambiente.

- Reúna los tubos Qubit necesarios y el tubo de 1,5 ml o 5 ml para la preparación de la solución de trabajo, según el volumen necesario.
- Prepare dos tubos de ensayo para los estándares y uno para cada pool.
- Prepare la solución de trabajo de 200 µL Qubit con 199 µL de tampón Qubit y 1 µL de tinte Qubit por muestra/estándar que se va a cuantificar.
- Agite la solución de trabajo durante 2-3 segundos y luego haga un pulso de centrifuga.
- Distribuya proporcionalmente **190 µL** de solución de trabajo en cada uno de los tubos estándar.
- Distribuya proporcionalmente **198 µL** de solución de trabajo en cada uno de los tubos estándar.
- Distribuya proporcionalmente **10 µL** de solución estándar en cada uno de los tubos estándar respectivos.
- Distribuya proporcionalmente **2 µl** de cada pool en el tubo respectivo.
- Agite todos los tubos durante 2-3 segundos y luego haga un pulso de centrifuga.
- Incube la placa durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- Inserte los tubos en el fluorímetro Qubit y tome las lecturas (consulte el protocolo del fabricante del Qubit para obtener más información).
- Registre las lecturas de Qubit en la tabla del cuaderno de trabajo para calcular el promedio por pool.

NOTA: El rendimiento esperado de la librería es de aproximadamente 30-100 ng/µL, pero puede variar dependiendo de la calidad y la aportación del ADN. Se espera que un rendimiento de 10 ng/µl o más proporcione resultados satisfactorios de enriquecimiento.

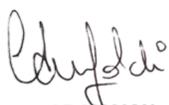
2.5 Visualización en TapeStation (opcional)

NOTA: Después de la validación del usuario, se pueden utilizar sistemas alternativos para la visualización de fragmentos, como Fragment Analyzer, Bioanalyzer o similares.

- Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por muestra (µL)	Preparación necesaria
Ladder D1000	2 °C a 8 °C Suministrado por el usuario	1	Póngalo a temperatura ambiente.
Tampón de muestra D1000	2 °C a 8 °C Suministrado por el usuario	3	Póngalo a temperatura ambiente.

- Reúna la ScreenTape D1000 necesaria, así como las tiras y las tapas de los tubos ópticos TapeStation.
- Transfiera 1 µl de cada librería enriquecida previamente a un nuevo tubo.
- Añada 1 µl de Ladder D1000 a un tubo de referencia.
- Añada 3 µl de tampón de muestra D1000 a cada tubo de librería preenriquecida y tubo de referencia.
- Selle todos los tubos con las tapas.
- Agite todos los tubos a fondo usando un vórtice IKA a 2000 rpm durante 1 minuto.
- Haga un breve pulso de centrifuga para asegurarse de que todas las muestras estén en el fondo de los tubos.
- Quite las tapas y cargue los tubos de muestra en el instrumento TapeStation 2200.



CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Amaboldi
M.P. 15533 • M.N. 13795
Dirección Técnica



Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

10. Seleccione los tubos necesarios en el software del controlador TapeStation 2200 y analice las muestras (consulte el manual de usuario de TapeStation para obtener más información).
11. Una vez finalizada la carrera, inicie TapeStation Analysis Software para ver los resultados (consulte el manual de usuario de TapeStation para obtener más información).
12. Registre los resultados en el cuaderno de trabajo.

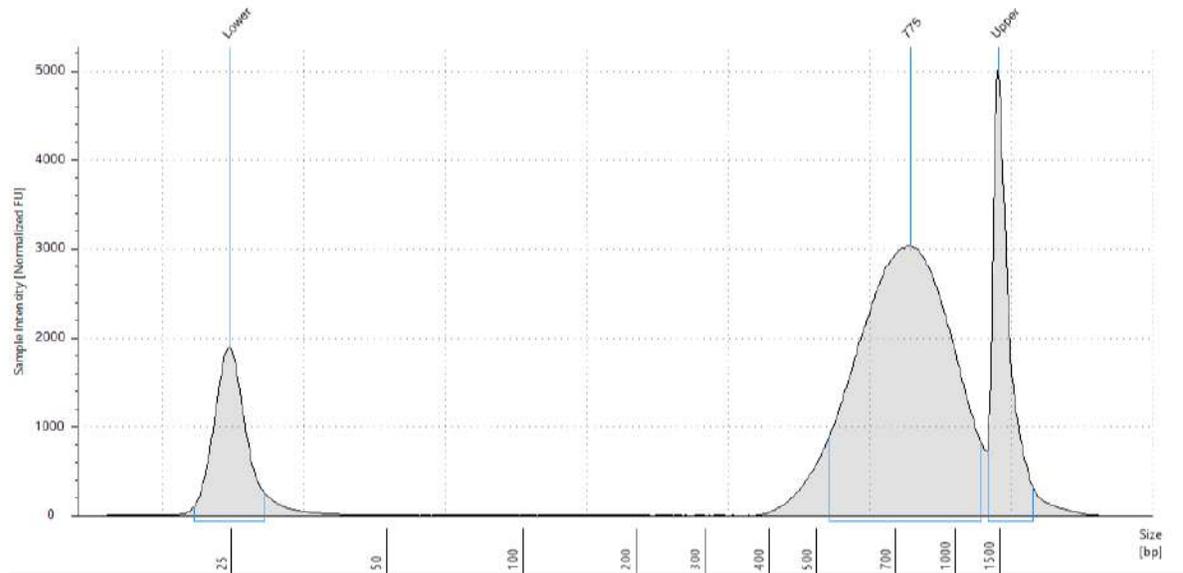


Figura 2.5.1: Imagen representativa de la traza de TapeStation para librerías.

Cecilia A. Arnaboldi

CROMOION s.r.l.
 Farm. Cecilia A. Arnaboldi
 M.P. 15533 - M.N. 13795
 Dirección Técnica

Oscar A. García

Oscar A. García
 Socio gerente
 Cromoion

3. Captura híbrida (flujo de trabajo Early Pooling)

3.0 Introducción al protocolo

- Siga el protocolo AlloSeq Tx a continuación en el orden que se muestra y utilizando los parámetros especificados.
- Antes de continuar, confirme el contenido del kit y asegúrese de que dispone de los insumos y el equipo necesarios.
- Para facilitar su uso, los pasos del protocolo para la captura híbrida también se detallan en IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD. Las referencias al cuaderno de trabajo del Capítulo 3 pertenecen a este cuaderno.

3.1 Hibridación de sondas

1. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por pool (µL)	Preparación necesaria
Panel de sondas AlloSeq Tx	-15 °C a -25 °C CAJA 4	10	Póngalo a temperatura ambiente.
Tampón de hibridación 1	-15 °C a -25 °C CAJA 4	50	Coloque en Hybex a 58 °C durante 15 minutos. Agite e inspeccione visualmente. Si el precipitado permanece, incube a 58 °C durante otros 15 minutos.
Tampón de hibridación 2	2 °C a 8 °C CAJA 5	10	Póngalo a temperatura ambiente.

2. Agite y realice un pulso de centrifuga de todos los reactivos antes de usarlos.
3. Reúna los tubos/tiras y tapas de PCR.

NOTA: No hay un punto de parada seguro hasta después del protocolo de captura. Los pools de muestras deben proceder directamente del paso de retención de 62 °C de la reacción de termociclaje de hibridación hasta la captura de beads y los pasos de lavado calentados.

NOTA: El proceso tarda aproximadamente 20 minutos en configurarse y un mínimo de 1,5 horas y un máximo de 18 horas en termociclador (las reacciones que se dejan durante la noche o hasta 18 horas deben mantenerse a una temperatura de 62 °C en el paso de retención final de la reacción).

4. Para cada reacción de hibridación, combine los siguientes reactivos en el orden indicado a continuación en un tubo/tira de PCR:

Reactivo	Volumen por pool (µL)
Pool de librerías de muestras	30
Panel de sondas AlloSeq Tx	10
Tampón de hibridación 1	50
Tampón de hibridación 2	10
Total	100

5. Con una pipeta ajustada a 70 µL, mezcle cada pocillo de reacción de hibridación 10 veces, coloque la tapa y realice un pulso de centrifuga.
6. Si la solución permanece turbia, mezcle 6-8 veces más, coloque la tapa y realice un pulso de centrifuga
7. Coloque el tubo/tira en el termociclador y ejecute el programa de hibridación con la tapa calentada a 100 °C, y un volumen de reacción de 100 µl:

N.º	Paso	Temperatura	Tiempo	N.º de ciclos
1	Desnaturalización	98°C	5 minutos	1
2	Ramp Down	98 °C - 62 °C, disminuyendo 2 °C/ciclo	1 minuto	1
3	Vaya al paso 2 para 18 ciclos más (total de 19 ciclos), disminuyendo 2 °C/ciclo.			
4	Hibridación	62°C	60 minutos	1
5	Retención final	62°C	Retención (no supere 18 horas a 62 °C, incluido el paso n.º 4)	1

- Deje el tubo/tira en el termociclador hasta que esté listo para proceder con la captura. Asegúrese de que los beads de captura han alcanzado la temperatura ambiente y que el tampón de lavado de captura y el Hybex se calientan a 58 °C.

3.2 Captura

- Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por pool (µL)	Preparación necesaria
Capture Beads	2 °C a 8 °C CAJA 5	250	Póngalos a temperatura ambiente al menos 30 minutos.
Tampón de lavado de captura	-15 °C a -25 °C CAJA 4	800	Precaliente hasta 58 °C antes de usarlo.
Tampón de elución de captura 1	-15 °C a -25 °C CAJA 4	28.5	Póngalo a temperatura ambiente.
2N NaOH	-15 °C a -25 °C CAJA 4	1.5	Póngalo a temperatura ambiente. Tras el uso, devuélvalos a almacenamiento para pasos posteriores.
Tampón de elución de captura 2	2 °C a 8 °C CAJA 5	4	Póngalo a temperatura ambiente.

- Prepare una mezcla maestra de elución de los siguientes reactivos por pool que se va a capturar:

Reactivo	Volumen por pool (µL)
Tampón de elución de captura 1	28.5
2N NaOH (fresco)	1.5

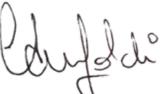
NOTA: La solución de NaOH absorberá fácilmente CO₂ de la atmósfera, alterando el pH y el rendimiento del reactivo. Asegúrese de que el tubo de NaOH 2N está sellado cuando no se esté utilizando.

- Agite y realice un pulso de centrifuga de todos los reactivos antes de usarlos.
- Reúna los tubos de micropulso de 1,5 ml, los tubos/tiras y tapas de PCR necesarios.

NOTA: Este proceso tarda aproximadamente 1 hora.

- Para cada reacción de hibridación, añada 250 µl de beads de captura a un tubo de 1,5 ml nuevo.
- Transfiera** 100 µl de cada reacción de hibridación al tubo correspondiente que contenga Capture Beads.
- Agite el tubo a alta velocidad durante 10 segundos. No centrifugue ni haga un pulso de centrifuga.
- Incube el tubo a 58 °C en Hybex durante 15 minutos.
- Haga un pulso de centrifuga rápido del tubo.


Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion


CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Amaboldi
M.P. 15533 • M.N. 13795
Dirección Técnica

10. Coloque inmediatamente el tubo sobre un imán durante 30 segundos, permitiendo que los beads se acumulen junto al imán.
11. Con una pipeta, aspire y deseche el sobrenadante, dejando los beads en el tubo junto al imán.
12. Lave tres veces con tampón de lavado de captura calentado como se describe a continuación:

NOTA: Cuando no lo esté usando, mantenga el tampón de lavado de captura en el Hybex para mantener una temperatura de 58 °C. Retírelo solo inmediatamente antes del Hybex antes de añadirlo a la reacción en los pasos 12b y 14. Trabaje rápidamente al realizar los pasos de lavado con calor para minimizar el tiempo que el pool de muestras/tampón está a temperatura ambiente.

- a) Retire el tubo del imán,
 - b) Añada 200 µl de tampón de lavado de captura calentado (58 °C),
 - c) Agite el tubo a alta velocidad durante 10 segundos. No centrifugue ni haga un pulso de centrífuga.
 - d) Incube el tubo a 58 °C en Hybex durante 5 minutos.
 - e) Realice un pulso de centrífuga y coloque inmediatamente el tubo en un imán durante 30 segundos, permitiendo que los beads se acumulen junto al imán.
 - f) Con una pipeta, aspire y deseche el sobrenadante, dejando los beads en el tubo junto al imán.
 - g) Repita los pasos a) a f) dos veces más para un total de 3 lavados.
13. Retire el tubo del imán.
 14. Añada 200 µl de tampón de lavado de captura calentado (58 °C).
 15. Agite el tubo a alta velocidad durante 10 segundos. No centrifugue ni haga un pulso de centrífuga.
 16. **Transfiera** todo el contenido (solución de lavado y beads) a un nuevo tubo de 1,5 ml.

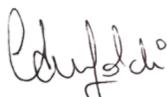
NOTA: Este paso de transferencia es fundamental para eliminar los inhibidores de PCR que pueden afectar al rendimiento posterior.

17. Incube el tubo a 58 °C en Hybex durante 5 minutos.
18. Realice inmediatamente un pulso de centrífuga y, a continuación, coloque el tubo en un imán durante 30 segundos, permitiendo que los beads se acumulen junto al imán.
19. Con una pipeta, aspire y deseche el sobrenadante, dejando los beads en el tubo junto al imán.
20. Realice un pulso de centrífuga rápidamente y coloque inmediatamente el tubo en un imán durante 30 segundos, permitiendo que los beads se acumulen junto al imán.
21. Con una pipeta P20, aspire y deseche el sobrenadante, dejando los beads en el tubo junto al imán.
22. Agite la mezcla maestra de elución preparada anteriormente, y luego saque el tubo de reacción del imán y añada 23 µl de mezcla maestra de elución a cada tubo.
23. Agite el tubo a alta velocidad durante 10 segundos.
24. Incube a temperatura ambiente durante 2 minutos.
25. Haga un pulso de centrífuga rápido del tubo.
26. Coloque el tubo en un imán durante 30 segundos, permitiendo que los beads se acumulen junto al imán.
27. Transfiera 21 µl de sobrenadante a un nuevo tubo/tira de PCR.
28. Añada 4 µl de tampón de lavado de captura 2.
29. Mezcla de pipeta 6-8 veces. El volumen final es de 25 µl.

NOTA: Punto de parada seguro. Las librerías pueden almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 24 horas.

3.3 PCR posterior al enriquecimiento

1. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:


CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Amaboldi
M.P. 15533 • M.N. 13795
Dirección Técnica


Oscar A. Garcia
Socio gerente
Cromoion

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por pool (µL)	Preparación necesaria
Cebadores de PCR	-15 °C a -25 °C CAJA 4	5	Descongele en hielo. Invierta para mezclar y luego centrifugue brevemente.
Mezcla de PCR (o Mezcla-2 de PCR si se utilizan kits de 96 muestras)	-15 °C a -25 °C CAJA 4	20	Descongele a temperatura ambiente y luego ponga en hielo.

2. Agite y realice un pulso de centrifuga de todos los reactivos antes de usarlos.
3. Reúna los tubos de PCR necesarios que contengan librerías de captura del paso 3.2.

NOTA: Este proceso tarda aproximadamente 5 minutos en establecerse, **1:40** horas en termociclador.

4. Añada 5 µl de cebadores de PCR a las librerías capturadas en el tubo de PCR.
5. Añada 20 µL de PCR Mix (o PCR Mix-2 si está utilizando kits de 96 muestras) al tubo.
6. Mezcle en pipeta 10 veces.
7. Haga un pulso de centrifuga rápido del tubo.
8. Coloque el tubo/tira en el termociclador y ejecute el programa de PCR posterior al enriquecimiento con la tapa calentada a 105 °C, y un volumen de reacción de 50 µL:

N.º	Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
1	Desnaturalización	98°C	30 segundos	1
2	Desnaturalización	98°C	1 minuto	17
3	Annealing	60°C	30 segundos	
4	Extensión	72°C	3 minutos	
5	Extensión final	72°C	5 minutos	1
6	Retención final	10°C	Retención	1

NOTA: Punto de parada seguro. Las librerías pueden almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 1 semana.

NOTA: Si procede inmediatamente a la purificación, asegúrese de que los beads de purificación se pongan a temperatura ambiente antes de su uso.

3.4 Purificación de PCR posterior al enriquecimiento

1. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por pool (µL)	Preparación necesaria
Purification Beads (Purification Beads-2 para kits de 96 muestras)	2 °C a 8 °C CAJA 5	27	Póngalos a temperatura ambiente al menos 30 minutos.
Agua estéril	15 °C a 30 °C Suministrado por el usuario	80	No necesita preparación.
Etanol al 100 %	15 °C a 30 °C Suministrado por el usuario	320	Prepare etanol al 80 % como se describe a continuación.
Tampón de resuspensión	2 °C a 8 °C CAJA 5	32	Póngalo a temperatura ambiente. Tras el uso, devuélvalos a almacenamiento para pasos posteriores.

2. Prepare etanol fresco al 80 % (2 lavados por pool) utilizando 480 µl de etanol al 100 % y 120 µl de agua estéril (se incluye un volumen en exceso).
3. Agite y realice un pulso de centrifuga de todos los reactivos antes de usarlos.
4. Reúna los tubos de microcentrifugación de 1,5 ml necesarios.

NOTA: El proceso tarda aproximadamente **30** minutos.

5. Para cada reacción de purificación, añada 27 µl de beads de purificación agitados a un tubo de 1,5 ml nuevo.
6. **Transfiera** 45 µl de cada reacción de PCR posterior al enriquecimiento al tubo correspondiente que contenga beads de purificación.
7. Agite cada tubo a alta velocidad durante 10 segundos.
8. Haga un pulso de centrifuga rápido del tubo.
9. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
10. Coloque el tubo en un imán durante 30 segundos, permitiendo que los beads se acumulen junto al imán.
11. Con una pipeta, aspire y deseche el sobrenadante, dejando los beads en el tubo junto al imán.
12. Manteniendo el tubo en el imán, lave dos veces con etanol al 80 %:
 - a) Añada 200 µL de etanol al 80 % a cada tubo,
 - b) Incube a temperatura ambiente durante 30 segundos,
 - c) Con una pipeta, aspire y deseche todo el sobrenadante,
 - d) Repita los pasos a) a c) para un total de 2 lavados.
13. Retire todo el sobrenadante restante con la pipeta P20.
14. Seque el tubo al aire durante 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir que el etanol residual se evapore.
15. Saque el tubo del imán y añada 32 µl de tampón de resuspensión a cada tubo para eluir los fragmentos objetivo.
16. Agite cada tubo a alta velocidad durante 10 segundos.
17. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
18. Haga un pulso de centrifuga rápido del tubo.
19. Coloque el tubo sobre un imán durante 30 segundos, permitiendo que los beads se acumulen junto al imán.
20. **Transfiera** 30 µl de sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml para su almacenamiento.

NOTA: Punto de parada seguro. Las librerías pueden almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 1 mes.

3.5 Cuantificación Qubit

1. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por pool (µL)	Preparación necesaria
Tampón Qubit BR	-25 °C a 30 °C Suministrado por el usuario	199	No necesita preparación.
Tinte Qubit BR	-25 °C a 30 °C Suministrado por el usuario	1	No necesita preparación.
Estándar BR n.º 1	2 °C a 8 °C Suministrado por el usuario	10	Póngalo a temperatura ambiente.
Estándar BR n.º 2	2 °C a 8 °C Suministrado por el usuario	10	Póngalo a temperatura ambiente.

2. Reúna los tubos Qubit necesarios y el tubo de 1,5 ml o 5 ml para la preparación de la solución de trabajo, según el volumen necesario.
3. Prepare dos tubos de ensayo para los estándares y uno para cada pool.
4. Prepare la solución de trabajo de 200 µL Qubit con 199 µL de tampón Qubit y 1 µL de tinte Qubit por muestra/estándar que se va a cuantificar.
5. Agite la solución de trabajo durante 2-3 segundos y luego haga un pulso de centrifuga.
6. Distribuya proporcionalmente **190 µL** de solución de trabajo en cada uno de los tubos estándar.

Cecilia A. Amaboldi

7. Distribuya proporcionalmente **198 µL** de solución de trabajo en cada uno de los tubos estándar.
8. Distribuya proporcionalmente **10 µL** de solución estándar en cada uno de los tubos estándar respectivos.
9. Distribuya proporcionalmente **2 µl** de cada pool en el tubo respectivo.
10. Agite todos los tubos durante 2-3 segundos y luego haga un pulso de centrifuga.
11. Incube la placa durante 2 minutos a temperatura ambiente.
12. Inserte los tubos en el fluorímetro Qubit y tome las lecturas (consulte el protocolo del fabricante del Qubit para obtener más información).
13. Registre las lecturas de Qubit en la tabla del cuaderno de trabajo para calcular el promedio de concentración.

3.6 Visualización en TapeStation (opcional)

NOTA: Después de la validación del usuario, se pueden utilizar sistemas alternativos para la visualización de fragmentos, como Fragment Analyzer, Bioanalyzer o similares.

1. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por pool (µL)	Preparación necesaria
Ladder D1000	2 °C a 8 °C Suministrado por el usuario	1	Póngalo a temperatura ambiente.
Tampón de muestra D1000	2 °C a 8 °C Suministrado por el usuario	3	Póngalo a temperatura ambiente.

2. Reúna la ScreenTape D1000 necesaria, así como las tiras y las tapas de los tubos ópticos TapeStation.
3. Transfiera 1 µl de cada pool enriquecido a un nuevo tubo.
4. Añada 1 µl de Ladder D1000 a un tubo de referencia.
5. Añada 3 µl de tampón de muestra D1000 a cada tubo del pool y tubo de referencia.
6. Selle todos los tubos con las tapas.
7. Agite todos los tubos a fondo usando un vórtice IKA a 2000 rpm durante 1 minuto.
8. Haga un breve pulso de centrifuga para asegurarse de que todas las muestras estén en el fondo de los tubos.
9. Quite las tapas y cargue los tubos de muestra en el instrumento TapeStation 2200.
10. Seleccione los tubos necesarios en el software del controlador TapeStation 2200 y analice las muestras (consulte el manual de usuario de TapeStation para obtener más información).
11. Una vez finalizada la carrera, inicie TapeStation Analysis Software para ver los resultados (consulte el manual de usuario de TapeStation para obtener más información).
12. Registre los resultados en la tabla del cuaderno de trabajo.

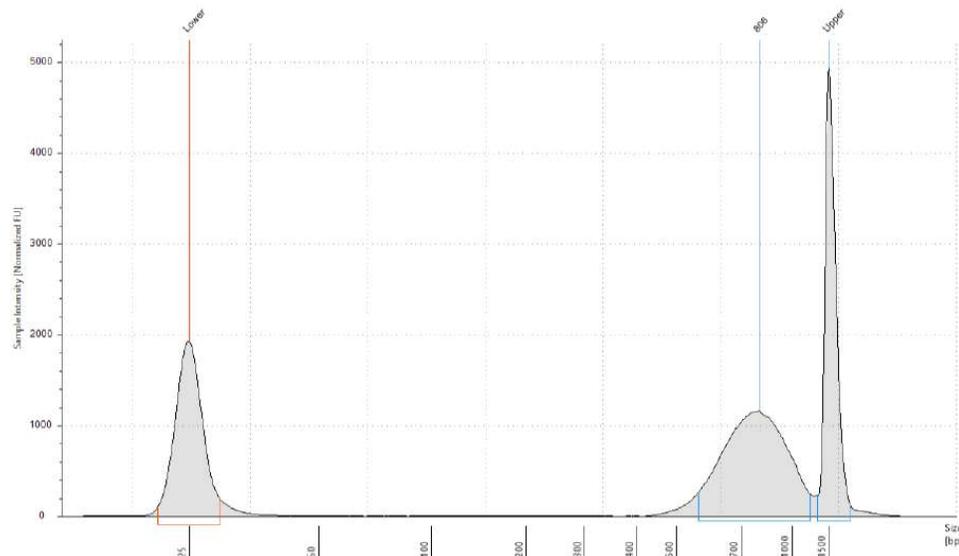


Figura 3.6.1: Imagen representativa de la traza de TapeStation para un pool de librerías enriquecidas.

4. Preparación de la librería (flujo de trabajo Original)

4.0 Introducción al protocolo

- Siga el protocolo AlloSeq Tx a continuación en el orden que se muestra y utilizando los parámetros especificados.
- Antes de continuar, confirme el contenido del kit y asegúrese de que dispone de los insumos y el equipo necesarios.
- Para facilitar su uso, los pasos del protocolo para la preparación de la librería también se detallan en *IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD*. Las referencias al cuaderno de trabajo del Capítulo 4 pertenecen a este cuaderno.

4.1 Preparación de la muestra

1. Introduzca el ID del experimento, la descripción, el operador y la fecha en el cuaderno de trabajo.
2. Seleccione el conjunto de sondas AlloSeq que se va a utilizar para el experimento en el menú desplegable del cuaderno de trabajo.
3. Seleccione el tipo de secuenciador que se va a utilizar en el menú desplegable del cuaderno.
4. Introduzca el ID de las muestras que se van a probar en la sección amarilla del diseño de placa del cuaderno de trabajo, según la configuración deseada.

NOTA: Solamente se pueden introducir caracteres alfanuméricos. Los ID de muestra duplicados se señalarán en rojo para pedir al usuario que los corrija. Es un requisito del software del secuenciador tener solamente ID de muestra únicos en una carrera. No introduzca ninguna información para los pocillos que no estén destinados a contener ninguna muestra.

5. Seleccione el conjunto de índices deseado de la lista desplegable naranja bajo Diseño de la placa en el cuaderno de trabajo.
6. Si es necesario, y utilizando el formato de índice de tubos, el orden del índice i7 puede modificarse. Seleccione el índice i7 alternativo que va a utilizar en la lista desplegable de opciones para la columna requerida. Si se seleccionan índices i7 duplicados, las celdas se señalarán en rojo para pedir al usuario que las corrija.
7. Si es necesario, y utilizando el formato de índice de tubos, el orden del índice i7 puede modificarse. Seleccione el índice i7 alternativo que va a utilizar en la lista desplegable Opciones para la columna requerida. Si se seleccionan índices i5 duplicados, las celdas se señalarán en rojo para pedir al usuario que las corrija.
8. Una vez completadas todas las acciones anteriores, haga clic en la pestaña 1.2 SampleSheet y revise. Se utilizará texto en rojo para señalar los lugares donde todavía se necesita información. Si no hay texto en rojo, la pestaña SampleSheet puede guardarse como un archivo CSV (delimitado por comas) (*.csv). Guarde el archivo como 'SampleSheet.csv'. Al guardar en formato CSV, solamente se guardará la pestaña activa. Abra el archivo SampleSheet.csv guardado en Excel y elimine las filas vacías de la tabla [Datos], es decir, las filas entre 22 y 117 que no contengan información sobre la muestra. Cuando haya terminado, guarde el archivo. La hoja de muestras estará lista y podrá importarse para la secuenciación en un secuenciador de Illumina.

4.2 Preparación de la librería

1. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por muestra (µL)	Preparación necesaria
Tampón de tagmentación	-15 °C a -25 °C CAJA 1	10	Póngalo a temperatura ambiente.
Agua estéril	15 °C a 30 °C. Suministrado por el usuario	30	No necesita preparación.
Beads de tagmentación	-15 °C a -25 °C CAJA 1	10	Póngalos a temperatura ambiente al menos 30 minutos.
Tampón de parada	15 °C a 30 °C CAJA 2	10	No necesita preparación.
Tampón de lavado de tagmentación	15 °C a 30 °C CAJA 2	300	No necesita preparación.
PCR Mix (o PCR Mix-1 si se utilizan kits de 96 muestras)	-15 °C a -25 °C CAJA 4 (o CAJA 1 si se utilizan 96 kits)	20	Descongele y manténgalos en hielo. Tras el uso, devuélvalos a almacenamiento para pasos posteriores.
Índices: ASTX17.1(24)-IVD: H503, H505, H506, H517, H705, H706, H707, H710, H711, H714 ASTX17.1(24)-B-IVD: H502, H507, H508, H521, H701, H702, H703, H704, H712, H715 ASTX17.1(96)-A-IVD/ASTX9.1(96)-A-IVD: H503, H505, H506, H517, H502, H507, H508, H521, H705, H706, H707, H710, H711, H714, H701, H702, H703, H704, H712, H715 ASTX17.1(96)-B-IVD/ASTX9.1(96)-B-IVD: H510, H511, H513, H522, H515, H516, H518, H520, H716, H718, H719, H720, H721, H722, H723, H724, H726, H727, H728, H729	-15 °C a -25 °C CAJA 3	10 total	Descongele y manténgalos en hielo.

- Agite y realice un pulso de centrifuga de todos los reactivos antes de usarlos.
- Reúna la placa con esquina cortada de 96 pocillos necesaria, el Microseal B y los tubos de microcentrifugación de 1,5 ml.

NOTA: No hay un punto de parada seguro hasta la PCR de indexación. El proceso dura aproximadamente **1:50** horas (incluidos 50 minutos de termociclaje de PCR).

- Para cada muestra de ADN, introduzca alícuotas de 10 µL de muestra de 10-100 ng/µL en el pocillo adecuado de una placa de PCR según el diseño de la placa en la hoja 1.0 Sample_Prep.
- Prepare 40 µL de mezcla maestra de tagmentación por muestra usando; 10 µL de tampón de tagmentación, 20 µL de agua estéril y 10 µL de beads de tagmentación.
- Mezcle la mezcla maestra anterior con un agitador vortex y, a continuación, realice un pulso de centrifuga.
- Pipetee 40 µL de la mezcla maestra de tagmentación en cada pocillo que contenga una muestra de ADN.
- Selle la placa con film Microseal B.
- Haga un pulso de centrifuga de la placa a 100 x g durante 10 segundos para recoger todos los reactivos del fondo del pocillo.
- Utilice el agitador de placas para mezclar a 1600 r/min durante 1 minuto.

11. Inspeccione visualmente la placa:
 - a) Si los beads no están distribuidos uniformemente en el pocillo, repita el agitado según el paso 10,
 - b) Si el material no está en el fondo del pozo o ha salpicado en el film Microseal B, realice un pulso de centrifuga y repita el paso de agitado 10.
12. Coloque la placa en el termociclador y ejecute el programa de Tagmentación con la tapa calentada a 105 °C, y el volumen de reacción 50 µL:

Temperatura	Tiempo
55°C	5 minutos
10°C	2 minutos

13. Una vez finalizado el programa, retire inmediatamente la placa del termociclador y déjela a temperatura ambiente durante 2 minutos.
14. Retire el film Microseal B.
15. Añada 10 µl de Stop Buffer a cada pocillo de reacción.
16. Vuelva a sellar la placa con film Microseal B.
17. Utilice el agitador de placas para mezclar a 1600 r/min durante 1 minuto.
18. Incube la placa durante 5 minutos adicionales a temperatura ambiente.
19. Durante la incubación, retire el PCR Mix (o PCR Mix-1, si está utilizando kits de 96 muestras) y los índices del congelador para descongelarlos y, a continuación, colóquelos sobre hielo/gradilla fría.
20. Inspeccione visualmente la placa. Si el material no está en la parte inferior del pocillo o se ha salpicado sobre el film Microseal B, gire y agite la placa.
21. Lave tres veces con tampón de lavado de tagmentación como se describe a continuación:
 - a) Retire el Microseal B y coloque la placa en el soporte magnético-96 durante 1 minuto, permitiendo que los beads se acumulen en los pocillos junto al imán,
 - b) Con una pipeta, aspire y deseche el sobrenadante, dejando los beads en los pocillos junto al imán,
 - c) Añada lentamente 100 µL de tampón de lavado de la tagmentación a cada pocillo,
 - d) Vuelva a sellar la placa con nuevo film Microseal B; asegúrese de que el film está correctamente fijado,
 - e) Utilice el agitador de placas para mezclar a 1800 r/min durante 2 minutos a temperatura ambiente,
 - f) **PRECAUCIÓN:** Si las muestras han salpicado en el sello, haga un pulso de centrifuga a 100 x g durante 10 segundos antes de retirar el sello,
 - g) Repita los pasos a) a f) dos veces más para un total de 3 lavados.

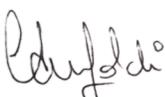
NOTA: Antes de desechar el sobrenadante del tercer lavado, prepare la mezcla maestra de PCR como se describe a continuación.

22. Prepare una mezcla maestra de PCR de 40 µL usando 20 µL de agua estéril y 20 µL de Mezcla de PCR (o Mezcla-1 de PCR si se utilizan 96 kits de prueba).

NOTA: La mezcla de PCR se utiliza para posteriores pasos del protocolo. No deseche este tubo.

23. Retire el Microseal B y coloque la placa en el soporte magnético-96 durante 1 minuto, permitiendo que los beads se acumulen en los pocillos junto al imán.
24. Con una pipeta ajustada a 100 µl, aspire y deseche el sobrenadante del lavado de tagmentación final.
25. Retire la placa del soporte magnético.
26. Añada 40 µL de la mezcla maestra de PCR a cada pocillo.
27. Selle la placa con film Microseal B.
28. Utilice el agitador de placas para mezclar a 1800 r/min durante 2 minutos a temperatura ambiente.
29. Haga un pulso de centrifuga de la placa a 100 x g durante 10 segundos para asegurarse de que todos los beads estén suspendidos dentro de la mezcla maestra de PCR.

Para tubos de indexación (T),


CROMOION s.r.l.
 Farm. Cecilia A. Amaboldi
 M.P. 15533 • M.N. 13795
 Dirección Técnica


Oscar A. García
 Socio gerente
 Cromoion

30. (T) Agite y haga un pulso por centrifuga de los tubos de indexación para garantizar que todo el volumen se encuentre en la parte inferior del tubo.
 31. (T) Retire el film Microseal B de la placa de muestras.
 32. (T) Añada 5 µL del índice i7 a cada pocillo, de acuerdo con el diseño de la placa en la hoja 1.0 Sample_Prep.
 33. (T) Añada 5 µL del índice i5 a cada pocillo, de acuerdo con el diseño de la placa en la hoja 1.0 Sample_Prep.
- Vaya al paso 34.

Para placa de indexación (P),

30. (P) Utilice el agitador de placas para mezclar la placa de indexación a 1800 r/min durante 1 minuto.
 31. (P) Centrifugue la placa de indexación a 100 x g durante 10 segundos para recoger todos los reactivos del fondo del pocillo.
 32. (P) Retire el film Microseal B de la placa de muestras.
 33. (P) **Confirme que la orientación de la placa y el conjunto de índices sean correctos. No despegue el sello de film.** Perfore el sello de film de la placa de indexación con una punta. Con una punta nueva, transfiera 10 µL de los índices combinados de la placa de indexación a cada pocillo de muestra, según la disposición de la placa en la hoja 1.0 Sample_Prep.
- Vaya al paso 34.
34. Vuelva a sellar con film Microseal B nuevo.
 35. Utilice el agitador de placas para mezclar a 1800 r/min durante 1 minuto a temperatura ambiente.
 36. Haga un pulso de centrifuga de la placa a 100 x g durante 10 segundos para recoger todos los reactivos del fondo del pocillo. Realice una inspección visual para asegurarse de que los beads siguen distribuyéndose uniformemente en la solución. Si los beads no están distribuidos uniformemente, repita el agitado según el paso 35.
 37. Coloque la placa en el termociclador y ejecute el programa de PCR de indexación con la tapa calentada a 105 °C y un volumen de reacción de 50 µl:

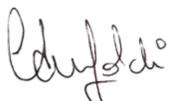
N.º	Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
1	Gap fill	72°C	3 minutos	1
2	Desnaturalización inicial	98°C	3 minutos	1
3	Desnaturalización	98°C	20 segundos	9
4	Annealing	60°C	30 segundos	
5	Extensión	72°C	3 minutos	
6	Extensión final	72°C	3 minutos	1
7	Retención final	10°C	Retención	1

NOTA: Punto de parada seguro. Las librerías pueden almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 1 semana.

NOTA: Si procede inmediatamente a la selección del tamaño y la purificación, asegúrese de que los beads de purificación se pongan a temperatura ambiente antes de su uso.

4.3 Selección de tamaño y purificación

1. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:


CROMOION s.r.l.
 Farm. Cecilia A. Amaboldi
 M.P. 15533 • M.N. 13795
 Dirección Técnica


 Oscar A. García
 Socio gerente
 Cromoion

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por muestra (µL)	Preparación necesaria
Beads de purificación (Beads de purificación-1 para kits de 96 muestras)	2°C a 8°C CAJA 5	110.8	Póngalos a temperatura ambiente al menos 30 minutos. Tras el uso, devuélvalos a almacenamiento para pasos posteriores.
Agua estéril	15 °C a 30 °C. Suministrado por el usuario	215	No necesita preparación.
Etanol al 100 %	15 °C a 30 °C. Suministrado por el usuario	320	Prepare etanol al 80 % como se describe a continuación.
Tampón de resuspensión	2°C a 8°C. CAJA 5	17	Póngalo a temperatura ambiente. Tras el uso, devuélvalos a almacenamiento para pasos posteriores.

2. Prepare beads de purificación diluidos usando 90 µL de beads de purificación y 135 µL de agua estéril por muestra. Asegúrese de la correcta agitación de los beads de purificación antes del uso.
3. Prepare 600 µL de etanol al 80 % fresco por muestra, suficiente para 2 lavados, utilizando 480 µL de etanol al 100 % y 120 µL de agua estéril (se incluye un volumen en exceso).
4. Agite y realice un pulso de centrifuga de todos los reactivos antes de usarlos.
5. Reúna las placas MIDI necesarias, Microseal B y placas PCR.

NOTA: El proceso tarda aproximadamente 1 hora.

6. Distribuya proporcionalmente 225 µL de beads de purificación diluidos en los pocillos apropiados de una placa MIDI (según el diseño de la placa de la hoja 1.0 Sample_Prep).
7. Pipetee los beads de tagmentación y el sobrenadante del PCR de indexación **o bien** agite la placa del PCR de indexación durante 1 minuto a 1800 r/min y, a continuación, añada 45 µL de cada mezcla al pocillo correspondiente de la placa MIDI que contiene beads de purificación diluidos.
8. Selle la placa MIDI con film Microseal B.
9. Utilice el agitador de placas para mezclar a 1800 r/min durante 2 minutos.
10. Incube la placa durante 5 minutos a temperatura ambiente. Durante esta incubación, los fragmentos más grandes se unen a los gránulos.
11. Placa de centrifugación a 280 x g durante 1 minuto.
12. Retire el Microseal B y coloque la placa en el soporte magnético-96 durante 5 minutos, permitiendo que los beads se acumulen en los pocillos junto al imán.
13. **Transfiera 260 µL del sobrenadante a una nueva placa MIDI o limpie los pocillos de la misma placa.**
14. Añada 20,8 µL de Purification Beads debidamente agitados (sin diluir) a cada muestra. Vuelva a sellar con film Microseal B.
15. Utilice el agitador de placas para mezclar a 1800 r/min durante 1 minuto.
16. Incube la placa durante 5 minutos a temperatura ambiente. Durante esta incubación, los fragmentos de tamaño objetivo se unen a los gránulos.
17. Retire el Microseal B y coloque la placa en el soporte magnético-96 durante 5 minutos, permitiendo que los beads se acumulen en los pocillos junto al imán.
18. Con una pipeta, aspire y deseche el sobrenadante, dejando los beads en los pocillos junto al imán.
19. Manteniendo la placa en el imán, lave dos veces con etanol al 80 %:
 - a) Añada 200 µL de etanol al 80 % a cada muestra,
 - b) Incube a temperatura ambiente durante 30 segundos,
 - c) Con una pipeta, aspire y deseche todo el sobrenadante,
 - d) Repita los pasos a) a c) para un total de 2 lavados.


 Oscar A. García
 Socio gerente
 Cromoion

20. Retire todo el sobrenadante restante con la pipeta P20.
21. Seque la placa al aire durante 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir que el etanol residual se evapore.
22. Añada 17 µL de tampón de resuspensión a cada pocillo para eluir los fragmentos objetivo.
23. Selle la placa con film Microseal B.
24. Utilice el agitador de placas para mezclar a 1800 r/min durante 2 minutos.
25. Incube la placa durante 5 minutos a temperatura ambiente.
26. Placa de centrifugación a 280 x g durante 30 segundos.
27. Retire el Microseal B y coloque la placa en el soporte magnético-96 durante 5 minutos, permitiendo que los beads se acumulen en los pocillos junto al imán.
28. **Transfiera** 15 µL de sobrenadante a una nueva placa de PCR para su almacenamiento.

NOTA: Punto de parada seguro. Las librerías pueden almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 1 mes.

4.4 Cuantificación Qubit (opcional)

1. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por muestra (µL)	Preparación necesaria
Tampón Qubit BR	-25°C a 30 °C. Suministrado por el usuario	199	No necesita preparación.
Tinte Qubit BR	-25°C a 30 °C. Suministrado por el usuario	1	No necesita preparación.
Estándar BR n.º 1	2°C a 8°C. Suministrado por el usuario	10	Póngalo a temperatura ambiente.
Estándar BR n.º 2	2°C a 8°C. Suministrado por el usuario	10	Póngalo a temperatura ambiente.

2. Reúna los tubos Qubit necesarios y el tubo de 1,5 ml o 5 ml para la preparación de la solución de trabajo, según el volumen necesario.
3. Prepare dos tubos de ensayo para los estándares y uno para cada muestra.
4. Prepare la solución de trabajo de 200 µl Qubit con 199 µl de tampón Qubit y 1 µl de tinte Qubit por muestra/estándar que se va a cuantificar.
5. Agite la solución de trabajo durante 2-3 segundos y luego haga un pulso de centrifuga.
6. Distribuya proporcionalmente **190 µL** de solución de trabajo en cada uno de los tubos estándar.
7. Distribuya proporcionalmente **198 µl** de solución de trabajo en cada uno de los tubos de muestra.
8. Distribuya proporcionalmente **10 µl** de solución estándar en cada uno de los tubos estándar respectivos.
9. Distribuya proporcionalmente **2 µL** de cada muestra en el tubo respectivo.
10. Agite todos los tubos durante 2-3 segundos y luego haga un pulso de centrifuga.
11. Incube la placa durante 2 minutos a temperatura ambiente.
12. Inserte los tubos en el fluorímetro Qubit y tome las lecturas (consulte el protocolo Qubit para obtener más información).
13. Registre las lecturas de Qubit en la tabla del cuaderno de trabajo para calcular el promedio por muestra.

NOTA: El rendimiento esperado de la librería es de aproximadamente 30 ng/µl, pero puede variar dependiendo de la calidad y la aportación del ADN. Se espera que un rendimiento de 10 ng/µl o más proporcione resultados satisfactorios de enriquecimiento.

4.5 Visualización en TapeStation (opcional)

NOTA: Después de la validación del usuario, se pueden utilizar sistemas alternativos para la visualización de fragmentos, como Fragment Analyzer, Bioanalyzer o similares.

1. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por muestra (μL)	Preparación necesaria
Ladder D1000	2 °C a 8 °C Suministrado por el usuario	1	Póngalo a temperatura ambiente.
Tampón de muestra D1000	2 °C a 8 °C Suministrado por el usuario	3	Póngalo a temperatura ambiente.

2. Reúna la ScreenTape D1000 necesaria, una placa de muestras de 96 pocillos (paredes finas) y sello de film.
3. Transfiera 1 μL de cada librería preenriquecida a una nueva placa de PCR de 96 pocillos.
4. Añada 1 μL de Ladder D1000 en un pocillo de referencia.
5. Añada 3 μL de tampón de muestra D1000 a cada pocillo de librería preenriquecida y pocillo de referencia.
6. Selle la placa con film de aluminio.
7. Agite con un vórtice IKA a 2000 rpm durante 1 minuto.
8. Haga un breve pulso de centrifuga para asegurarse de que todas las muestras estén en el fondo de los pocillos.
9. Cargue la placa de muestra en el instrumento TapeStation 2200.
10. Seleccione los pocillos necesarios en el software del controlador TapeStation 2200 y analice las muestras (consulte el manual de usuario de TapeStation para obtener más información).
11. Una vez finalizada la carrera, inicie TapeStation Analysis Software para ver los resultados (consulte el manual de usuario de TapeStation para obtener más información).
12. Registre los resultados en el cuaderno de trabajo.

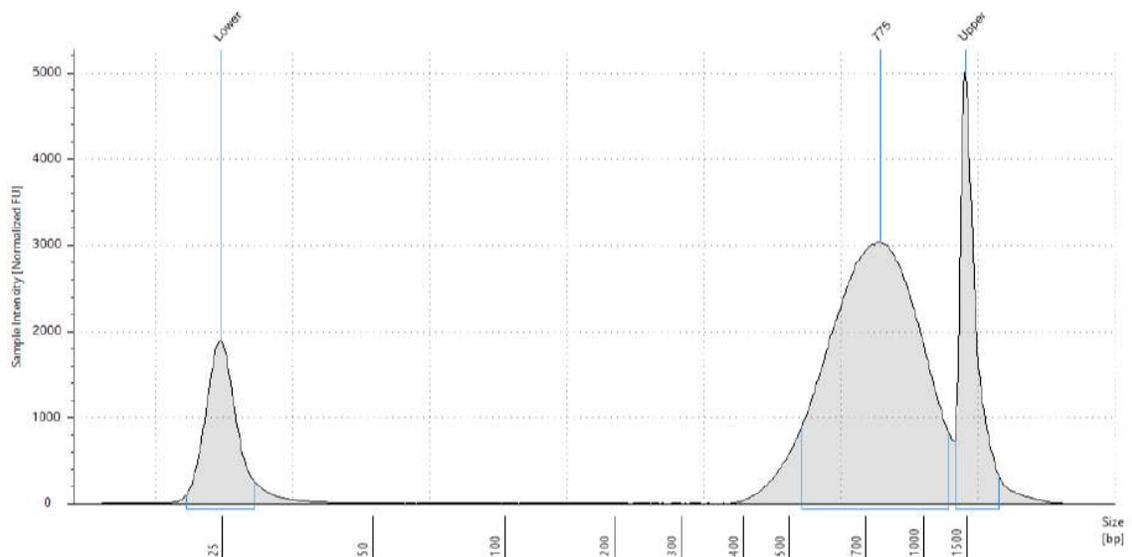
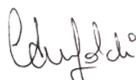


Figura 4.5.1: Imagen representativa de la traza de TapeStation para librerías.


CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Amaboldi
M.P. 15533 • M.N. 13795
Dirección Técnica


Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

5. Captura híbrida (flujo de trabajo Original)

5.0 Introducción al protocolo

- Siga el protocolo AlloSeq Tx a continuación en el orden que se muestra y utilizando los parámetros especificados.
- Antes de continuar, confirme el contenido del kit y asegúrese de que dispone de los insumos y el equipo necesarios.
- Para facilitar su uso, los pasos del protocolo para la captura híbrida también se detallan en *IIFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD*. Las referencias al cuaderno de trabajo del Capítulo 5 pertenecen a este cuaderno.

5.1 Agrupación de muestras

1. Introduzca un ID de experimento en el campo amarillo apropiado del cuaderno de trabajo.
2. Introduzca el número de pools que se van a procesar en el campo amarillo correspondiente del cuaderno de trabajo.
3. Copie la información de la muestra apropiada de la pestaña 1.1 Vista lineal de *IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD* y péguela en la Lista de pools de librerías de *IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD* mediante la opción de pegado especial "Formato de valores y números".
4. Si se van a agrupar ≤ 12 muestras, añada 2,5 μL de cada librería que se vaya a enriquecer en un tubo/tira de PCR y añada el volumen adecuado de tampón de resuspensión al total de 30 μL , según la tabla siguiente.
5. Si se van a agrupar > 12 muestras o menos, añada 2,5 μL de cada librería para enriquecerla en un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml y proceda con el paso de concentración (1.1 del cuaderno de trabajo *IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD*).
6. Si está procesando varios pools, duplique esta pestaña y siga los pasos 1-5 anteriores, identificando de forma única cada pool.

NOTA: Las librerías de menor rendimiento pueden beneficiarse con el uso de un volumen de aportación de librería más grande (que no exceda el volumen total de aportación de librería combinado de 30 μL). Se recomienda el procesamiento de librerías de bajo rendimiento en un pool de enriquecimiento separado de librerías de alto rendimiento (genómicas), siempre que sea posible. Para obtener asesoramiento específico, póngase en contacto con su representante técnico local.

5.2 Concentración de pools de librerías (opcional)

1. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por pool (μL)	Preparación necesaria
Purification Beads (Purification Beads-1 para kits de 96 muestras)	2 °C a 8 °C CAJA 5	58,5 - 108	Póngalos a temperatura ambiente al menos 30 minutos. Tras el uso, devuélvalos a almacenamiento para pasos posteriores.
Agua estéril	15 °C a 30 °C. Suministrado por el usuario	480	No necesita preparación.
Etanol al 100 %	15 °C a 30 °C. Suministrado por el usuario	1.920	Prepare etanol al 80 % como se describe a continuación.
Tampón de resuspensión	2 °C a 8 °C CAJA 5	32	Póngalo a temperatura ambiente. Tras el uso, devuélvalos a almacenamiento para pasos posteriores.

2. Prepare etanol fresco al 80 % (2 lavados por muestra) utilizando 1920 µL de etanol al 100 % y 480 µL de agua estéril (se incluye un volumen en exceso).
3. Agite y realice un pulso de centrifuga de todos los reactivos antes de usarlos.
4. Reúna los tubos de microcentrifugación de 1,5 ml necesarios.

NOTA: El proceso tarda aproximadamente 30 minutos.

5. Agrupe las librerías de muestras, en un tubo de 1,5 ml, según las instrucciones del cuaderno de trabajo de agrupación de muestras 1.0.
6. Añada el volumen adecuado (1,8 veces el volumen de la muestra agrupada o ver los cálculos en el cuaderno de trabajo) de Purification Beads bien agitadas en el tubo de 1,5 mL que contiene las librerías agrupadas.
7. Agite cada tubo a alta velocidad durante 10 segundos, 3 veces.
8. Haga un pulso de centrifuga rápido del tubo.
9. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
10. Coloque el tubo en un imán durante 1 minuto (hasta 2,5 minutos para 96 librerías de muestras), permitiendo que los beads se acumulen junto al imán. Si el sobrenadante se mantiene turbio, déjelo en el imán hasta que se aclare.
11. Con una pipeta, aspire y deseche el sobrenadante, dejando los beads en el tubo junto al imán.
12. Manteniendo el tubo en el imán, lave dos veces con etanol al 80 %:
 - a) Añada 800 µL de etanol al 80 % a cada tubo,
 - b) Incube a temperatura ambiente durante 30 segundos,
 - c) Con una pipeta, aspire y deseche todo el sobrenadante,
 - d) Repita los pasos a) a c) para un total de 2 lavados.
13. Retire todo el sobrenadante restante con la pipeta P20.
14. Seque el tubo al aire durante 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir que el etanol residual se evapore.
15. Añada 32 µl de tampón de resuspensión al tubo para eluir las bibliotecas.
16. Agite cada tubo a alta velocidad durante 10 segundos, 3 veces.
17. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
18. Haga un pulso de centrifuga rápido del tubo.
19. Coloque el tubo sobre un imán durante 1 minuto, permitiendo que los beads se acumulen junto al imán.
20. **Transfiera** 30 µl de sobrenadante a una nueva placa de PCR para su almacenamiento.

NOTA: Punto de parada seguro. Las librerías pueden almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 1 semana.

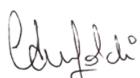
5.3 Hibridación de sondas

1. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por pool (µL)	Preparación necesaria
Panel de sondas AlloSeq Tx	-15 °C a -25 °C CAJA 4	10	Póngalo a temperatura ambiente.
Tampón de hibridación 1	-15 °C a -25 °C CAJA 4	50	Coloque en Hybex a 50°C durante 15 minutos. Agite e inspeccione visualmente; si el precipitado permanece, incube a 50 °C durante otros 15 minutos.
Tampón de hibridación 2	2 °C a 8 °C CAJA 5	10	Póngalo a temperatura ambiente.

2. Agite y realice un pulso de centrifuga de todos los reactivos antes de usarlos.
3. Reúna los tubos/tiras y tapas de PCR.


 Oscar A. García
 Socio gerente
 Cromoion


 CROMOION s.r.l.
 Farm. Cecilia A. Arnaboldi
 M.P. 15533 • M.N. 13795
 Dirección Técnica

NOTA: No hay un punto de parada seguro hasta después del protocolo de captura. Los pools de muestras deben proceder directamente del paso de retención de 62 °C de la reacción de termociclaje de hibridación hasta la captura de beads y los pasos de lavado calentados.

NOTA: El proceso tarda aproximadamente 20 minutos en configurarse y un mínimo de 2 horas y un máximo de 18 horas en termociclador (las reacciones que se dejan durante la noche o hasta 18 horas deben mantenerse a una temperatura de 62 °C en el paso de retención final de la reacción).

4. Para cada reacción de hibridación, combine los siguientes reactivos en el orden indicado a continuación en un tubo/tira de PCR:

Reactivo	Volumen por pool (µL)
Pool de librerías de muestras	30
Panel de sondas AlloSeq Tx	10
Tampón de hibridación 1	50
Tampón de hibridación 2	10
Total	100

5. Con una pipeta ajustada a 70 µL, mezcle cada pocillo de reacción de hibridación 10 veces, selle y realice un pulso de impulsos.
6. Si la solución permanece turbia, mezcle 6-8 veces más con la pipeta.
7. Coloque el tubo/tira en el termociclador y ejecute el programa de hibridación con la tapa calentada a **100 °C**, y un volumen de reacción de 100 µl:

N.º	Paso	Temperatura	Tiempo	N.º de ciclos
1	Desnaturalización	98°C	5 minutos	1
2	Ramp Down	98 °C - 62 °C, disminuyendo 2 °C/ciclo	1 minuto	1
3	Vaya al paso 2 para 18 ciclos más (total de 19 ciclos), disminuyendo 2 °C/ciclo.			
4	Hibridación	62°C	90 minutos	1
5	Retención final	62°C	Retención (no supere 18 horas a 62 °C, incluido el paso n.º 4)	1

8. Deje el tubo/tira en el termociclador hasta que esté listo para proceder con la captura. Asegúrese de que los beads de captura han alcanzado la temperatura ambiente y que el tampón de lavado de captura y el Hybex se calientan a 58 °C.
9. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por pool (µL)	Preparación necesaria
Capture Beads	2 °C a 8 °C CAJA 5	250	Póngalos a temperatura ambiente al menos 30 minutos.
Tampón de lavado de captura	-15 °C a -25 °C CAJA 4	800	Precaliente hasta 58 °C antes de usarlo.
Tampón de elución de captura 1	-15 °C a -25 °C CAJA 4	28.5	Póngalo a temperatura ambiente.
2N NaOH	-15 °C a -25 °C CAJA 4	1.5	Póngalo a temperatura ambiente. Tras el uso, devuélvalos a almacenamiento para pasos posteriores.
Tampón de elución de captura 2	2 °C a 8 °C CAJA 5	4	Póngalo a temperatura ambiente.

5.4 Captura

1. Prepare una mezcla maestra de elución de los siguientes reactivos por pool que se va a capturar:

Reactivo	Volumen por pool (µL)
Tampón de elución de captura 1	28.5
2N NaOH (fresco)	1.5

NOTA: La solución de NaOH absorberá fácilmente CO₂ de la atmósfera, alterando el pH y el rendimiento del reactivo. Asegúrese de que el tubo de NaOH 2N está sellado cuando no se esté utilizando.

2. Agite y realice un pulso de centrifuga de todos los reactivos antes de usarlos.
3. Reúna los tubos de micropulso de 1,5 ml, los tubos/tiras y tapas de PCR necesarios.

NOTA: Este proceso tarda aproximadamente 1 hora.

4. Para cada reacción de hibridación, añada 250 µl de beads de captura a un tubo de 1,5 ml nuevo.
5. **Transfiera** 100 µl de cada reacción de hibridación al tubo correspondiente que contenga Capture Beads.
6. Agite el tubo a alta velocidad durante 10 segundos, 3 veces. No centrifugue ni haga un pulso de centrifuga.
7. Incube el tubo a 58 °C en Hybex durante 15 minutos.
8. Haga un pulso de centrifuga rápido del tubo.
9. Coloque inmediatamente el tubo sobre un imán durante 1 minuto, permitiendo que los beads se acumulen junto al imán.
10. Con una pipeta, aspire y deseche el sobrenadante, dejando los beads en el tubo junto al imán.
11. Lave tres veces con tampón de lavado de captura calentado como se describe a continuación:

NOTA: Cuando no lo esté usando, mantenga el tampón de lavado de captura en el Hybex para mantener una temperatura de 58 °C. Retírelo solo inmediatamente antes del añadido a la reacción en los pasos 12b y 14. Trabaje rápidamente al realizar los pasos de lavado con calor para minimizar el tiempo que el pool de muestras/tampón está a temperatura ambiente.

- a) Retire el tubo del imán,
 - b) Añada 200 µl de tampón de lavado de captura calentado (58 °C),
 - c) Agite el tubo a alta velocidad durante 10 segundos, 3 veces. No centrifugue ni haga un pulso de centrifuga.
 - d) Incube el tubo a 58 °C en Hybex durante 5 minutos.
 - e) Realice un pulso de centrifuga y coloque inmediatamente el tubo en un imán de 1,5 ml durante 1 minuto, permitiendo que los beads se acumulen junto al imán.
 - f) Con una pipeta, aspire y deseche el sobrenadante, dejando los beads en el tubo junto al imán.
 - g) Repita los pasos a) a f) dos veces más para un total de 3 lavados.
12. Retire el tubo del imán.
 13. Añada 200 µl de tampón de lavado de captura calentado (58 °C).
 14. Agite el tubo a alta velocidad durante 10 segundos, 3 veces. No centrifugue ni haga un pulso de centrifuga.
 15. **Transfiera** todo el contenido (solución de lavado y beads) a un nuevo tubo de 1,5 ml.

NOTA: Este paso de transferencia es fundamental para eliminar los inhibidores de PCR que pueden afectar al rendimiento posterior.

16. Incube el tubo a 58 °C en Hybex durante 5 minutos.
17. Realice inmediatamente un pulso de centrifuga y, a continuación, coloque el tubo en un imán durante 1 minuto, permitiendo que los beads se acumulen junto al imán.
18. Con una pipeta, aspire y deseche el sobrenadante, dejando los beads en el tubo junto al imán.
19. Realice un pulso de centrifuga rápidamente y coloque inmediatamente el tubo en un imán durante 1 minuto, permitiendo que los beads se acumulen junto al imán.
20. Con una pipeta P20, aspire y deseche el sobrenadante, dejando los beads en el tubo junto al imán.

21. Agite la mezcla maestra de elución preparada anteriormente, y luego saque el tubo de reacción del imán y añada 23 µl de mezcla maestra de elución a cada tubo.
22. Agite el tubo a alta velocidad durante 10 segundos, 3 veces.
23. Incube a temperatura ambiente durante 2 minutos.
24. Haga un pulso de centrifuga rápido del tubo.
25. Coloque el tubo en un imán durante 1 minuto, permitiendo que los beads se acumulen junto al imán.
26. **Transfiera** 21 µl de sobrenadante a un nuevo tubo/tira de PCR.
27. Añada 4 µl de tampón de lavado de captura 2.
28. Mezcla de pipeta 6-8 veces. El volumen final es de 25 µl.

NOTA: Punto de parada seguro. Las librerías pueden almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 24 horas.

5.5 PCR posterior al enriquecimiento

1. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por pool (µL)	Preparación necesaria
Cebadores de PCR	-15 °C a -25 °C CAJA 4	5	Descongele en hielo. Invierta para mezclar y luego centrifugue brevemente.
PCR Mix (o PCR Mix-2 si se utilizan kits de 96 muestras)	-15 °C a -25 °C CAJA 4	20	Descongele a temperatura ambiente y luego ponga en hielo.

2. Agite y realice un pulso de centrifuga de todos los reactivos antes de usarlos.
3. Reúna los tubos de PCR necesarios que contengan librerías de captura del paso 5.4.

NOTA: Este proceso tarda aproximadamente 5 minutos en establecerse, **1:40** horas en termociclador.

4. Añada 5 µl de cebadores de PCR a las librerías capturadas en el tubo de PCR.
5. Añada 20 µL de PCR Mix (o PCR Mix-2 si está utilizando kits de 96 muestras) al tubo.
6. Mezcle en pipeta 10 veces.
7. Haga un pulso de centrifuga rápido del tubo.
8. Coloque el tubo/tira en el termociclador y ejecute el programa de PCR posterior al enriquecimiento con la tapa calentada a 105 °C, y un volumen de reacción de 50 µL:

N.º	Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
1	Desnaturalización	98°C	30 segundos	1
2	Desnaturalización	98°C	1 minuto	17
3	Annealing	60°C	30 segundos	
4	Extensión	72°C	3 minutos	
5	Extensión final	72°C	5 minutos	1
6	Retención final	10°C	Retención	1

NOTA: Punto de parada seguro. Las librerías pueden almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 1 semana.

NOTA: Si procede inmediatamente a la purificación, asegúrese de que los beads de purificación se pongan a temperatura ambiente antes de su uso.

5.6 Purificación de PCR posterior al enriquecimiento

1. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por pool (µL)	Preparación necesaria
Purification Beads (Purification Beads-2 para kits de 96 muestras)	2 °C a 8 °C CAJA 5	27	Póngalos a temperatura ambiente al menos 30 minutos.
Agua estéril	15 °C a 30 °C Suministrado por el usuario	80	No necesita preparación.
Etanol al 100 %	15 °C a 30 °C Suministrado por el usuario	320	Prepare etanol al 80 % como se describe a continuación.
Tampón de resuspensión	2 °C a 8 °C CAJA 5	32	Póngalo a temperatura ambiente. Tras el uso, devuélvalos a almacenamiento para pasos posteriores.

2. Prepare etanol fresco al 80 % (2 lavados por muestra) utilizando 480 µl de etanol al 100 % y 120 µl de agua estéril (se incluye un volumen en exceso).
3. Agite y realice un pulso de centrifuga de todos los reactivos antes de usarlos.
4. Reúna los tubos de microcentrifugación de 1,5 ml necesarios.

NOTA: El proceso tarda aproximadamente **30** minutos.

5. Para cada reacción de purificación, añada 27 µl de beads de purificación agitados a un tubo de 1,5 ml nuevo.
6. **Transfiera** 45 µl de cada reacción de PCR posterior al enriquecimiento al tubo correspondiente que contenga Purification Beads.
7. Agite cada tubo a alta velocidad durante 10 segundos, 3 veces.
8. Haga un pulso de centrifuga rápido del tubo.
9. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
10. Coloque el tubo en un imán durante 1 minuto, o hasta que todos los beads se acumulen sobre el imán.
11. Con una pipeta, aspire y deseche el sobrenadante, dejando los beads en el tubo junto al imán.
12. Manteniendo el tubo en el imán, lave dos veces con etanol al 80 %:
 - a) Añada 200 µL de etanol al 80 % a cada tubo,
 - b) Incube a temperatura ambiente durante 30 segundos,
 - c) Con una pipeta, aspire y deseche todo el sobrenadante,
 - d) Repita los pasos a) a c) para un total de 2 lavados.
13. Retire todo el sobrenadante restante con la pipeta P20.
14. Seque el tubo al aire durante 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir que el etanol residual se evapore.
15. Saque el tubo del imán y añada 32 µl de tampón de resuspensión a cada tubo para eluir los fragmentos objetivo.
16. Agite cada tubo a alta velocidad durante 10 segundos, 3 veces.
17. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
18. Haga un pulso de centrifuga rápido del tubo.
19. Coloque los tubos sobre un imán durante 1 minuto, permitiendo que los beads se acumulen junto al imán.
20. **Transfiera** 30 µl de sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml para su almacenamiento.

NOTA: Punto de parada seguro. Las librerías pueden almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 1 mes.

5.7 Cuantificación Qubit

1. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por pool (µL)	Preparación necesaria
Tampón Qubit BR	-25 °C a 30 °C Suministrado por el usuario	199	No necesita preparación.
Tinte Qubit BR	-25 °C a 30 °C Suministrado por el usuario	1	No necesita preparación.
Estándar BR n.º 1	2 °C a 8 °C Suministrado por el usuario	10	Póngalo a temperatura ambiente.
Estándar BR n.º 2	2 °C a 8 °C Suministrado por el usuario	10	Póngalo a temperatura ambiente.

2. Reúna los tubos Qubit necesarios y el tubo de 1,5 ml o 5 ml para la preparación de la solución de trabajo, según el volumen necesario.
3. Prepare dos tubos de ensayo para los estándares y uno para cada pool.
4. Prepare la solución de trabajo de 200 µl Qubit con 199 µl de tampón Qubit y 1 µl de tinte Qubit por muestra/estándar que se va a cuantificar.
5. Agite la solución de trabajo durante 2-3 segundos y luego haga un pulso de centrifuga.
6. Distribuya proporcionalmente **190 µL** de solución de trabajo en cada uno de los tubos estándar.
7. Distribuya proporcionalmente **198 µL** de solución de trabajo en cada uno de los tubos estándar.
8. Distribuya proporcionalmente **10 µL** de solución estándar en cada uno de los tubos estándar respectivos.
9. Distribuya proporcionalmente **2 µl** de cada pool en el tubo respectivo.
10. Agite todos los tubos durante 2-3 segundos y luego haga un pulso de centrifuga.
11. Incube la placa durante 2 minutos a temperatura ambiente.
12. Inserte los tubos en el fluorímetro Qubit y tome las lecturas (consulte el protocolo del fabricante del Qubit para obtener más información).
13. Registre las lecturas de Qubit en la tabla del cuaderno de trabajo para calcular el promedio de concentración.

5.8 Visualización en TapeStation (opcional)

NOTA: Después de la validación del usuario, se pueden utilizar sistemas alternativos para la visualización de fragmentos, como Fragment Analyzer, Bioanalyzer o similares.

1. Reúna los reactivos necesarios (volumen especificado en la tabla siguiente) y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por pool (µL)	Preparación necesaria
Ladder D1000	2 °C a 8 °C Suministrado por el usuario	1	Póngalo a temperatura ambiente.
Tampón de muestra D1000	2 °C a 8 °C Suministrado por el usuario	3	Póngalo a temperatura ambiente.

2. Reúna la ScreenTape D1000 necesaria, así como las tiras y las tapas de los tubos ópticos TapeStation.
3. Transfiera 1 µl de cada pool enriquecido a un nuevo tubo.
4. Añada 1 µl de Ladder D1000 a un tubo de referencia.
5. Añada 3 µl de tampón de muestra D1000 a cada tubo del pool y tubo de referencia.
6. Selle todos los tubos con las tapas.
7. Agite todos los tubos a fondo usando un vórtice IKA a 2000 rpm durante 1 minuto.
8. Haga un breve pulso de centrifuga para asegurarse de que todas las muestras estén en el fondo de los tubos.
9. Quite las tapas y cargue los tubos de muestra en el instrumento TapeStation 2200.

10. Seleccione los tubos necesarios en el software del controlador TapeStation 2200 y analice las muestras (consulte el manual de usuario de TapeStation para obtener más información).
11. Una vez finalizada la carrera, inicie TapeStation Analysis Software para ver los resultados (consulte el manual de usuario de TapeStation para obtener más información).
12. Registre los resultados en la tabla del cuaderno de trabajo.

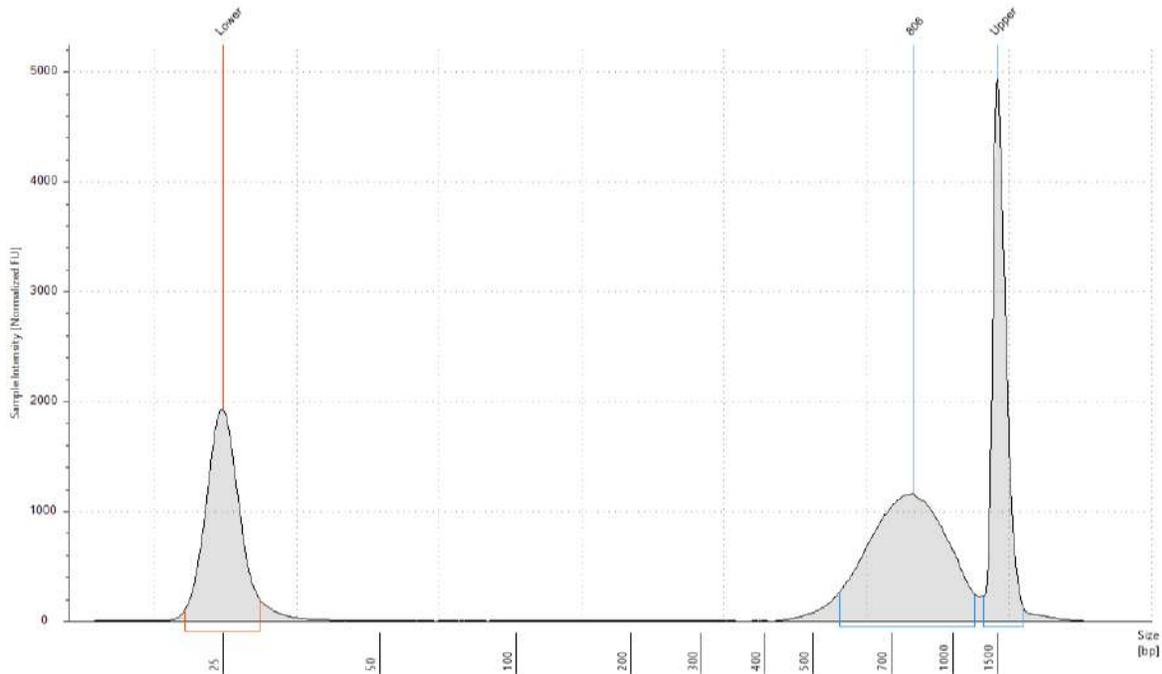


Figura 5.8.1: Imagen representativa de la traza de TapeStation para un pool de librerías enriquecidas.

6. Secuenciación

6.0 Introducción al protocolo

Las librerías AlloSeq Tx se validan para la secuenciación que se realiza en secuenciadores de Illumina, incluidos MiSeq, MiniSeq o iSeq, donde los datos de secuencia resultantes se envían en formato de archivo fastq. El número de muestras añadidas a cada pool enriquecido determinarán la celda del Flowcell de secuenciador necesario, según se indica en la sección 1.3 *Contenido genético dirigido de AlloSeq Tx* de este IFU.

- Siga el protocolo AlloSeq Tx a continuación en el orden que se muestra y utilizando los parámetros especificados.
- Antes de continuar, confirme el contenido del kit y asegúrese de que dispone de los insumos y el equipo necesarios.
- Para facilitar su uso, los pasos del protocolo para la secuenciación también se detallan en *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD* (Flujo de trabajo Early Pooling) e *IFU095-3_AlloSeq Tx Sequencing Workbook CE IVD* (Flujo de trabajo Original). Las referencias al cuaderno de trabajo del Capítulo 6 pertenecen a estos cuadernos de trabajo.
- Los secuenciadores deben cargarse de acuerdo con el protocolo del instrumento, según se indica en las instrucciones.
- Si se utiliza un instrumento MiSeq, se recomienda realizar el lavado de la línea de plantilla con lejía (hipoclorito de sodio) de acuerdo con las instrucciones de la guía del usuario del MiSeq para obtener un rendimiento óptimo.

NOTA: El archivo .csv de importación de muestras de secuenciación con formato Illumina se puede generar y guardar como se describe en *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD* (Hoja de trabajo "1.0 Sample_Prep"), desde "1.2 SampleSheet" (Flujo de trabajo Early Pooling) o *IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD* (Hoja de trabajo "1.0 Sample_Prep"), desde "1.2 SampleSheet" (Flujo de trabajo Original).

6.1 Preparación de PhiX

1. Reúna los reactivos necesarios y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Preparación necesaria
10 nM PhiX	-15 °C a -25 °C Suministrado por el usuario	Descongele y manténgalo en hielo.
2N NaOH	-15 °C a -25 °C CAJA 4	Póngalo a temperatura ambiente.
Agua estéril	15 °C a 30 °C Suministrado por el usuario	No necesita preparación.
Tampón de resuspensión	2 °C a 8 °C CAJA 5	Póngalo a temperatura ambiente.
HT1 (con cartucho de secuenciación)	-15 °C a -25 °C Suministrado por el usuario	Descongele y manténgalo en hielo.

1. Prepare una solución de trabajo de 0,2 NaOH utilizando 45 µl de agua estéril y 5 µl de 2N NaOH.

NOTA: La solución de NaOH absorberá fácilmente CO₂ de la atmósfera, alterando el pH y el rendimiento del reactivo. Asegúrese de que el tubo de NaOH 2N está sellado cuando no se esté utilizando.

2. Agite y realice un pulso de centrifuga de todos los reactivos antes de usarlos.
3. Reúna los tubos de microcentrifugación de 1,5 ml necesarios.

6.1.1 Dilución y desnaturalización de PhiX para carreras en MiSeq y MiniSeq

1. Añada 3 µl de tampón de resuspensión a un tubo nuevo.
2. Añada 2 µl de 10 nM PhiX al tubo.
3. Añada 5 µl de solución de trabajo de 0,2N NaOH (diluida arriba) al tubo.
4. Agite y realice un pulso de centrifuga del tubo.
5. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.

- Añada 990 µl de HT1 preenfriado al tubo que contiene PhiX desnaturalizado.
- Invierta para mezclar** (NO agite) y luego haga un pulso de centrifuga del tubo.

NOTA: Esto resulta en 1 ml de 20 pM PhiX que está listo para su uso en secuencias MiSeq. Para las secuencias MiniSeq, realice la dilución adicional ajustada a 5 pM descrita a continuación. El PhiX desnaturalizado puede almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 1 mes.

6.1.2 Para carreras de MiniSeq, diluya aún más el PhiX a 5 pM

- Introduzca el volumen de dilución deseado en el cuaderno de trabajo para calcular la dilución adecuada para el PhiX.
- Diluya PhiX a 5 pM combinando el volumen de reactivo (ver cuaderno) en un tubo de microcentrifugación.
- Invierta para mezclar** (NO agite) y luego haga un pulso de centrifuga del tubo.

NOTA: El PhiX desnaturalizado puede almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 1 mes.

6.1.3 Para carreras en iSeq, diluya PhiX a 20 pM (sin desnaturalizar)

- Introduzca el volumen de dilución deseado en el cuaderno de trabajo para calcular la dilución adecuada para el PhiX.
- Diluya PhiX a 20 pM combinando el volumen de reactivo (ver cuaderno) en un tubo de microcentrifugación.
- Invierta para mezclar** (NO agite) y luego haga un pulso de centrifuga del tubo.

NOTA: El PhiX desnaturalizado puede almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 1 mes.

6.2 Dilución y desnaturalización para MiSeq

- Reúna los reactivos necesarios y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Preparación necesaria
Pool de muestras enriquecidas AlloSeq Tx	-15 °C a -25 °C Preparado por el usuario	Descongele y manténgalo en hielo.
2N NaOH	-15 °C a -25 °C CAJA 4	Póngalo a temperatura ambiente.
Agua estéril	15 °C a 30 °C Suministrado por el usuario	No necesita preparación.
HT1 (con cartucho MiSeq)	-15 °C a -25 °C Suministrado por el usuario	Descongele y manténgalo en hielo.
Tampón de resuspensión	2 °C a 8 °C CAJA 5	Póngalo a temperatura ambiente.
20 pM PhiX (diluido previamente)	-15 °C a -25 °C Suministrado por el usuario	Descongele y manténgalo en hielo.

- Prepare una solución de trabajo de 0,2N NaOH utilizando 45 µl de agua estéril y 5 µl de 2N NaOH.

NOTA: La solución de NaOH absorberá fácilmente CO₂ de la atmósfera, alterando el pH y el rendimiento del reactivo. Asegúrese de que el tubo de NaOH 2N está sellado cuando no se esté utilizando.

- Agite y realice un pulso de centrifuga de todos los reactivos antes de usarlos.
- Reúna los tubos de microcentrifugación de 1,5 ml necesarios.
- Introduzca la concentración del pool de muestras enriquecidas, el tamaño de los fragmentos (previsto en aproximadamente 800 bp) y el volumen total deseado (recomendado 30 µl) a 4 nM en el cuaderno de trabajo para calcular la dilución adecuada para la biblioteca.

6. Diluya el pool de muestras a 4 nM combinando los reactivos (consulte el cuaderno) en un tubo de microcentrífuga.
7. Agite y realice un pulso por centrifuga del pool de muestras antes de su uso posterior.
8. Añada 5 µl del pool de muestras enriquecidas de 4 nM a un tubo nuevo.
9. Añada 5 µl de solución de trabajo de 0,2N NaOH (diluida arriba) al tubo.
10. Agite y realice un pulso de centrifuga del tubo.
11. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
12. Añada 990 µl de HT1 preenfriado al tubo que contiene el pool de muestras enriquecidas desnaturalizadas.
13. **Invierta para mezclar** (NO agite) y luego haga un pulso de centrifuga del tubo.

NOTA: Esto da como resultado 1 ml de un pool de muestras a 20 pM. Los pools pueden almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 1 mes.

14. Introduzca en el cuaderno de trabajo el número de pools que se van a combinar para la secuenciación, la concentración de carga (recomendado 12 pM), el % deseado de pico de PhiX (recomendado al 1 % como mínimo) y el volumen de carga (mínimo de 600 µl), con el fin de calcular la dilución adecuada para la biblioteca.
15. Diluya el pool de muestras a la concentración de carga combinando los reactivos (consulte el cuaderno) en un tubo de microcentrífuga.
16. **Invierta para mezclar** (NO agite) y luego haga un pulso de centrifuga del tubo.
17. Deje a un lado en hielo hasta que esté listo para ser cargado en el cartucho de reactivo MiSeq para la secuenciación.

NOTA: Los pools pueden almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 48 horas antes de la secuenciación.

18. Proceda a cargar el MiSeq de acuerdo con el protocolo del instrumento.

6.3 Dilución y desnaturalización para MiniSeq

1. Reúna los reactivos necesarios y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Preparación necesaria
Pool de muestras enriquecidas AlloSeq Tx	-15 °C a -25 °C Preparado por el usuario	Descongele y manténgalo en hielo.
2N NaOH	-15 °C a -25 °C CAJA 4	Póngalo a temperatura ambiente.
Agua estéril	15 °C a 30 °C Suministrado por el usuario	No necesita preparación.
HT1 (con cartucho de secuenciación)	-15 °C a -25 °C Suministrado por el usuario	Descongele y manténgalo en hielo.
Tampón de resuspensión	2 °C a 8 °C CAJA 5	Póngalo a temperatura ambiente.
200 mM Tris-HCl, pH 7,0	15 °C a 30 °C Suministrado por el usuario	No necesita preparación.
5 pM PhiX (diluido previamente)	-15 °C a -25 °C Suministrado por el usuario	Descongele y manténgalo en hielo.

2. Prepare una solución de trabajo de 0,1N NaOH utilizando 95 µl de agua estéril y 5 µl de 2N NaOH.

NOTA: La solución de NaOH absorberá fácilmente CO₂ de la atmósfera, alterando el pH y el rendimiento del reactivo. Asegúrese de que el tubo de NaOH 2N está sellado cuando no se esté utilizando.

3. Agite y realice un pulso de centrifuga de todos los reactivos antes de usarlos.
4. Reúna los tubos de microcentrifugación de 1,5 ml necesarios.

5. Introduzca la concentración del pool de muestras enriquecidas, el tamaño de los fragmentos (previsto en aproximadamente 800 bp) y el volumen total deseado (recomendado 100 µl) a 1 nM en el cuaderno de trabajo para calcular la dilución adecuada para la biblioteca.
6. Diluya el pool de muestras a 1 nM combinando los reactivos (consulte el cuaderno) en un tubo de microcentrífuga.
7. Agite y realice un pulso por centrifuga del pool de muestras antes de su uso posterior.
8. Añada 5 µl del pool de muestras enriquecidas de 1 nM a un tubo nuevo.
9. Añada 5 µl de solución de trabajo de 0,1N NaOH (diluida arriba) al tubo.
10. Agite y realice un pulso de centrifuga del tubo.
11. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
12. Añada 5 µl de 200 mM Tris-HCl, con pH 7,0.
13. Agite y realice un pulso de centrifuga del tubo.
14. Añada 985 µl de HT1 preenfriado al tubo que contiene el pool de muestras enriquecidas desnaturalizadas.
15. **Invierta para mezclar** (NO agite) y luego haga un pulso de centrifuga del tubo.

NOTA: Esto da como resultado 1 ml de un pool de muestras a 5 pM. Los pools pueden almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 1 mes.

16. Introduzca el número de pools que se van a combinar para la secuenciación, la concentración de carga (recomendado 1,6 pM), el % deseado de pico de PhiX (recomendado al 1 % como mínimo) y el volumen de carga (mínimo de 500 µl) en el cuaderno de trabajo para calcular la dilución adecuada para la biblioteca.
17. Diluya el pool de muestras a la concentración de carga combinando los reactivos (consulte el cuaderno) en un tubo de microcentrífuga.
18. **Invierta para mezclar** (NO agite) y luego haga un pulso de centrifuga del tubo.
19. Deje a un lado en hielo hasta que esté listo para ser cargado en el cartucho de reactivo MiniSeq para la secuenciación.

NOTA: Los pools pueden almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 48 horas antes de la secuenciación.

20. Proceda a cargar el MiniSeq de acuerdo con el protocolo del instrumento.

6.4 Dilución para iSeq

1. Reúna los reactivos necesarios y prepare según la tabla:

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Preparación necesaria
Pool de muestras enriquecidas AlloSeq Tx	-15 °C a -25 °C Preparado por el usuario	Descongele y manténgalo en hielo.
Tampón de resuspensión	2 °C a 8 °C CAJA 5	Póngalo a temperatura ambiente.
20 pM PhiX (diluido previamente)	-15 °C a -25 °C Suministrado por el usuario	Descongele y manténgalo en hielo.

2. Agite y realice un pulso de centrifuga de todos los reactivos antes de usarlos.
3. Reúna los tubos de microcentrifugación de 1,5 ml necesarios.
4. Introduzca la concentración del pool de muestras enriquecidas, el tamaño de los fragmentos (previsto en aproximadamente 800 bp) y el volumen total deseado (recomendado 100 µL) a 1 nM en el cuaderno de trabajo para calcular la dilución adecuada para la librería.
5. Diluya el pool de muestras a 1 nM combinando los reactivos (ver el cuaderno de trabajo) en un tubo de microcentrifuga.
6. Agite y realice un pulso por centrifuga del pool de muestras antes de su uso posterior.

7. Introduzca el número de pools que se van a combinar para la secuenciación, la concentración de carga (recomendado 200 pM), el % deseado de pico de PhiX (recomendado al 1 % como mínimo) y el volumen de carga (mínimo de 100 µl) en el cuaderno de trabajo para calcular la dilución adecuada para la librería.
8. Diluya el pool de muestras a la concentración de carga combinando los reactivos (ver el cuaderno de trabajo) en un tubo de microcentrífuga.
9. **Invierta para mezclar** (NO agite) y luego haga un pulso de centrifuga del tubo.
10. Deje a un lado en hielo hasta que esté listo para ser cargado en el cartucho de reactivo iSeq para la secuenciación.

NOTA: Los pools pueden almacenarse entre -15 °C y -25 °C durante un máximo de 48 horas antes de la secuenciación.

11. Proceda a cargar 20 µl de pool de muestras diluidas en el cartucho iSeq de acuerdo con el protocolo del instrumento.

7. Análisis de secuencias

Los archivos Fastq resultantes deben analizarse con el software AlloSeq Assign. Los procedimientos para el uso del software AlloSeq Assign se encuentran en *IFU094_AlloSeq Assign IFU CE IVD*.

8. Guía de solución de problemas

PROBLEMA	CAUSAS POSIBLES	Solución
Rendimiento bajo o nulo de la preparación de la librería (detectado por cuantificación Qubit)	Calidad baja o baja concentración de ADN aportado	Evalúe la calidad del ADN por electroforesis en gel. El ADN intacto debe ser de aproximadamente 3 kb con poca o ninguna evidencia de manchas en gel. Vuelva a extraer el ADN y repita el procedimiento siempre que sea posible.
	Se ha utilizado un tipo de muestra principal incorrecto.	Evite el uso de muestras de sangre entera que contengan heparina. Vuelva a extraer el ADN de la sangre entera conservada en ACD o EDTA y repita el procedimiento, siempre que sea posible.
	Librerías perdidas durante la captura	Consulte el protocolo. Asegúrese de que los pasos de purificación que retienen el sobrenadante; y los pasos que descartan el sobrenadante se siguen correctamente. Asegúrese de que la concentración de etanol es correcta. El uso de agua solamente o de un contenido excesivo de agua puede eluir el ADN prematuramente.
	Librerías no eluidas de beads de captura	Consulte el protocolo. Asegúrese de que se emplea el orden correcto de los tampones de elución. Asegúrese de retirar adecuadamente los reactivos/tampones antes de la resuspensión y elución. Evite el secado excesivo de ADN o pellets de ADN ligados a beads durante los pasos de secado. El secado prolongado de los pellets de ADN puede impedir la resuspensión y el rendimiento posterior.
	Falta de adición de reactivos críticos (es decir, gránulos, cebadores de indexación, mezcla maestra de PCR, etc.); o no se ha seguido el orden correcto.	Consulte el protocolo. Asegúrese de que los reactivos se han añadido en el orden correcto y en el volumen correcto. Compruebe si hay exceso de residuos en los volúmenes de reactivos. Repita el procedimiento, si se indica.

PROBLEMA	CAUSAS POSIBLES	Solución
	Condiciones de incubación o ciclaje incorrectas.	Revise las condiciones del termociclador: Programa de tagmentación Programa de PCR de indexación
Rendimiento bajo o nulo del enriquecimiento (detectado por cuantificación Qubit)	Librerías perdidas durante la captura	Revise el protocolo y asegúrese de que se siguen correctamente los pasos que requieren sobrenadante retenido y los que descartan el sobrenadante. Asegúrese de que los beads de purificación diluidos estén en la concentración correcta y que los beads de purificación sin diluir (no los residuos de los beads diluidos) se empleen tras la selección del tamaño.
	Librerías no eluidas de beads de captura	Asegúrese de que se emplea el orden correcto de los tampones de elución. Asegúrese de retirar adecuadamente los reactivos/tampones antes de la resuspensión y elución. Evite el secado excesivo de ADN o pellets de ADN ligados a beads durante los pasos de secado. El secado prolongado de los pellets de ADN puede reducir la capacidad de la solución resuspendida y el posterior rendimiento.
	Condiciones de incubación o ciclaje incorrectas.	Revise las condiciones del termociclador: Programa de hibridación Programa de PCR posterior al enriquecimiento
Fragmentos de tamaño incorrecto después de la preparación de la librería o enriquecimiento (detectado mediante análisis de fragmentos)	Relación incorrecta de la muestra con los beads de purificación.	Repita el protocolo. Asegúrese de que se utiliza la concentración de beads correcta durante los pasos de selección del tamaño y purificación del protocolo.
Fallo en la secuencia		Compruebe que se ha seguido el protocolo. Consulte el manual del usuario correspondiente para conocer el modelo de secuenciador utilizado.
Baja cobertura para locus objetivo en Assign a pesar de un alto rendimiento de enriquecimiento.	Fragmentos no específicos capturados debido a una temperatura más baja durante la captura y los pasos de lavado calentado.	Asegúrese de que el sistema Hybex utilizado para los pasos de lavado calentado está calibrado y en buenas condiciones de mantenimiento. Trabaje rápidamente durante los pasos de lavado calentado para garantizar que la temperatura del pool no baje sustancialmente.

9. Información complementaria

El protocolo descrito en esta guía asume que ha leído el contenido de esta sección y se han confirmado y obtenido todos los insumos y equipos necesarios.

Licencia

Los kits AlloSeq Tx contienen NextEra Flex para reactivos de enriquecimiento fabricados por Illumina Inc. para su distribución mediante CareDx Pty Ltd

Insumos y equipo necesarios pero no suministrados

Los insumos y los equipos que se enumeran a continuación son necesarios para realizar el ensayo, pero no se incluyen en el kit AlloSeq Tx.


Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

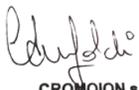
El protocolo se ha optimizado y validado utilizando los elementos enumerados. No se garantiza un rendimiento comparable cuando se utilizan insumos y equipos alternativos.

Insumo	N.º de proveedor/catálogo
Agua de grado PCR	Sigma-Aldrich, W3500
Etanol absoluto para biología molecular	Proveedor de laboratorio general
Kit de ensayo Qubit™ dsDNA BR	Thermo Fisher Scientific, Q32850 o Q32853
Tubos de ensayo Qubit™	Thermo Fisher Scientific, Q32856
ScreenTape D1000 (opcional)	Agilent Technologies, 5067-5584
Reactivos D1000 (opcional)	Agilent Technologies, 5067-5585
Placas de muestras de 96 pocillos (opcional)	Agilent Technologies, 5067-5150
Sello de film de placa de 96 pocillos (opcional)	Agilent Technologies, 5067-5154
Tiras de tubos ópticos (8 tiras) (opcional)	Agilent Technologies, 401428
Tapas de tiras de tubos ópticos (8 tiras) (opcional)	Agilent Technologies, 401425
Uno de los siguientes kits de reactivos de secuenciación:	
<ul style="list-style-type: none"> • MiSeq Reagent Kit v2 (300 ciclos) • MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300 ciclos) • MiSeq Reagent Nano Kit v2 (300 ciclos) • MiniSeq Mid Output Kit (300 ciclos) • iSeq 100 i1 Reagent v2 (300 ciclos) 	<ul style="list-style-type: none"> • Illumina, MS-102-2002 • Illumina, MS-103-1002 • Illumina, MS-103-1001 • Illumina, FC-420-1004 • Illumina, 20031371
PhiX Control v3	Illumina, FC-110-3001
Puntas de pipeta de barrera de 20 µl	Proveedor de laboratorio general
Puntas de pipeta de barrera de 200 µl	Proveedor de laboratorio general
Puntas de pipeta de barrera de 1000 µl	Proveedor de laboratorio general
Tubos de microcentrifugación de 1,5 mL	Proveedor de laboratorio general
Tubos de 5 ml	Proveedor de laboratorio general
Tubos de centrifuga cónicos de 15 ml	Proveedor de laboratorio general
Depósitos de reactivos de 25 ml	Proveedor de laboratorio general
Tiras de 8 tubos de PCR de 0,2 ml con tapas	Proveedor de laboratorio general
Placas de PCR de 96 pocillos	Proveedor de laboratorio general
Sellos adhesivos Microseal 'B'	Bio-Rad, MSB1001
Placa de almacenamiento de pocillos profundos de polipropileno de 0,8 ml Abgene™ de 96 pocillos (placa MIDI, solamente flujo de trabajo Original)	Thermo Fisher, AB0859 o AB0765
Hipoclorito de sodio (NaOCl) para lavado de secuenciación posterior a la ejecución (opcional)	Sigma, 239305

Equipos	N.º de proveedor/catálogo
Pipeta de 20 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipeta de 200 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipeta de 1000 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas multicanal de 20 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas multicanal de 200 µl	Proveedor de laboratorio general
Microcentrifuga	Proveedor de laboratorio general
Centrifuga de microplacas	Proveedor de laboratorio general
Agitador vortex	Proveedor de laboratorio general
Rodillo de film de sellado	Proveedor de laboratorio general
Placa de fijación para indexación	Illumina, FC-130-1005
Una de las siguientes gradillas magnéticas:	
<ul style="list-style-type: none"> • Imán DynaMag™-2 • Gradilla de separación MagJET, 2 tubos de 1,5 ml 	<ul style="list-style-type: none"> Thermo Fisher, 12321D Thermo Fisher, MR01
Soporte magnético-96	Thermo Fisher, AM10027
BioShake iQ, o bien	BioShake iQ, 1808-0506

Cromioion

Insumo	N.º de proveedor/catálogo
BioShake XP	BioShake iQ, 1808-0506
Sistema Agilent 2200 TapeStation (opcional)	Agilent Technologies
Fluorímetro Qubit	Thermo Fisher
Uno de los siguientes termocicladores de 96 pocillos:	
• Termociclador Veriti™ de 96 pocillos	Applied Biosystems, 4375786
• Termociclador Mastercycler Pro S	Eppendorf, 6325
U otro termociclador PCR con un rendimiento comparable. Los requisitos mínimos del termociclador PCR alternativo incluyen una función de tapa calentada a 105 °C para el programa PCR de indexación y un formato de bloque de tubos de 0,2 ml/placa de 96 pocillos.	
Sistema Hybex	SciGene, 1057-30-2
Bloque de tubos Hybex de 1,5 ml. (32 tubos de 1,5 ml).	SciGene, 1057-34-0
Uno de los siguientes secuenciadores:	
• Illumina MiSeq	Illumina, SY-410-1003
• Illumina MiSeq	Illumina, SY-410-1003
• Illumina MiniSeq	Illumina, 20021532



CROMOION s.r.l.
 Farm. Cecilia A. Amaboldi
 M.P. 15533 • M.N. 13795
 Dirección Técnica



Oscar A. García
 Socio gerente
 Cromoion

10. Información de contacto

Fabricante:

CareDx Pty Ltd,
20 Collie Street, Fremantle, WA, Australia, 6160.
Tel.: +61-8-9336-4212
Correo electrónico: orders-aus@caredx.com
Sitio web: <http://www.caredx.com>

Distribuido por:

Asia Pacífico (APAC)
CareDx Pty Ltd,
20 Collie Street, Fremantle, WA, Australia, 6160.
Tel.: +61-8-9336-4212
Correo electrónico: orders-aus@caredx.com
Sitio web: <http://www.caredx.com>

Europa, Oriente Medio y África (EMEA)
CareDx AB,
Franzégatan 5, SE-112 51 Estocolmo, Suecia.
Tel.: +46-8-508 939 00
Fax: +46-8-717 88 18
Correo electrónico: orders-se@caredx.com
Sitio web: <http://www.caredx.com/>

América
CareDx Lab Solutions Inc.,
901 S. Bolmar St., Suite R, West Chester, PA 19382
Tel.: 1-877-OLERUP1
Fax: 610-344-7989
Correo electrónico: orders-us@caredx.com
Sitio web: <http://www.caredx.com>

Asistencia técnica e información de incidentes graves:

Correo electrónico: techsupport-global@caredx.com

Cualquier incidente grave que se haya producido en relación con el producto se comunicará al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro o el Ministerio de Salud estatal en el que esté establecido el usuario y/o el paciente

Para más información, consulte el sitio web de CareDx (<https://www.caredx.com/contact-us/>).

Productos relacionados:

IVD con marca CE:
AlloSeq Assign

11. Referencias

1. Nota técnica de Illumina. **Nextera XT library prep: tips and troubleshooting** (06/29/18)
2. Nota técnica de Illumina. **DNA/RNA isolation considerations for Illumina library preparation kits.** (12/21/18)
3. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. **PCR inhibitors – occurrence, properties and removal.** 2012 J Appl Micro. 113:1014-26 (ver también las citas incluidas)
4. Demeke T, Jenkins GR. **Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits.** Anal Biol Chem. 2009 396:1977-90.
5. Wilson IG. **Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification.** 1997 Appl Environ Micro. 63:3741-51 (ver también las citas incluidas)
6. Al-Soud WA, Rådström P. **Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples.** App Env Micro. 1998 64:3748-53.
7. Sidstedt M, Hedman J, Romsos EL, Waitara L, Wadsö L, Steffen CR, Vallone PM, Rådström P. **Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR.** Anal Biol Chem. 2018 410:2569-83
8. Al-Soud WA, Rådström P. **Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells.** J Clin Micro. 2001 39:485-93
9. Yedidag EN, Koffron AJ, Mueller KH, Kaplan B, Kaufman DB, Fryer JP, Stuart FP, Abecassis M. **Acyclovir triphosphate inhibits the diagnostic polymerase chain reaction for cytomegalovirus.** Trasplante. 1996 27;62(2):238-42.
10. de Lomas JG, Sunzeri FJ, Busch MP. **False-negative results by polymerase chain reaction due to contamination by glove powder.** Transfusión. 1992 32:83-5.
11. Burgess LC, Hall JO. **UV Light Irradiation of Plastic Reaction Tubes Inhibits PCR.** Biotécnicas. 1999 27:252-57.
12. Picelli S, Bjorklund AK, Reinius B, Sagasser S, Winberg G, Sandberg R. **Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects.** Res. genoma 2014 24:2033-44.
13. Steiniger M, Adams CD, Marko JF, Reznikoff WS. **Defining characteristics of Tn5 Transposase non-specific DNA binding.** Res. ácido nucl. 2006 34:2920-34.
14. **CareDx AlloSure Interfering Substances report** 2018.

Historial de método

Versión	Fecha	Modificación
1.0	19Feb20	Primera versión de AlloSeq Tx IFU CE. Editada por E. Naughton el 19Feb20
1.1	28Apr20	Se añadió el ensayo AlloSeq Tx de secuencia de fragmentos de ADN con un tamaño promedio de 700 bp, lo que significa que los polimorfismos con una separación superior a 700 bp no pueden ser escalonados, lo que puede dar lugar a ambigüedades heterocigóticas. Editado por E. Naughton el 29 Abr 20
1.2	08May20	Actualización de sustancias interferentes. Reeditado por E. Naughton el 08May20
1.3	13May20	Se añadió la biotina a la tabla de sustancias interferentes. Se añadieron detalles de la muestra de control a la sección 1.9. Reeditado por E. Naughton el 14 May 20
1.4	20May20	Se actualizó la sección Contenido y requisitos de almacenamiento del kit AlloSeq Tx de 1.4 con las siguientes correcciones: 2x tubos para tampón de lavado de tagmentación, 2x tubos para tampón de lavado de captura. Reeditado por E. Naughton el 20 May 20
1.5	05Jun20	Se hicieron los siguientes cambios: - Se corrigió H714 en la tabla de reactivos de la sección 2.2, - Se añadió la referencia a la captura híbrida en la sección 3.0, - Se añadió la referencia a PhiX en Insumos - Se añadió la referencia a los cuadernos de trabajo para los puntos 3.1.5 y 3.2.5. Reeditado por E. Naughton el 05Jun20
1.6	20Oct20	Se añadió una nota sobre el uso de NaOH. Reeditado por E. Naughton el 20 Oct 20
2.0	26Mar21	Se actualizó el distribuidor de Viena a Estocolmo en la sección 8.0 según la CR 2020-097. Se actualizó el reactivo iSeq v1 discontinuado y se lo sustituyó por v2 en la sección 7.0 según CR 2020-077. Se corrigieron los ciclos de congelación y descongelación de 25 a 12 en la sección 1.4. Reeditado por S. Antony el 09 Abr 2021
3.0	6May21	Se actualizó lo siguiente: <ul style="list-style-type: none"> • Sección 1: la sección de cuadernos de trabajo de apoyo se cambió a la sección 9: se añadió IFU095-5. Se incluye una explicación relación con el flujo de trabajo Original frente a Early Pooling. Se añadió contenido de genes dirigidos ASTX17.1(24)-B-IVD. Se actualizó el formato de tablas de contenidos de kit Tx. Se añadió la referencia de hisopo bucal (RUO). Se corrigió el límite de detección para ADN no concentración de ADN. Se añadieron la advertencia H318 para NaOH 2N, las advertencias de peligro H351 y H373 para los beads de captura y la advertencia H351 para el tampón de hibridación 1; se añadió información de seguridad del tampón de parada a la tabla. • Sección 2: se añadió la sección de preparación de librerías (flujo de trabajo Early Pooling) • Sección 3: se añadió la sección Captura híbrida (flujo de trabajo Early Pooling) • Sección 4.1: se actualizó la descripción de preparación de muestras para que se corresponda con el cuaderno de trabajo actualizado • Sección 4.2: se añadieron los índices del conjunto B en la tabla, se actualizó la estimación de tiempo de 2:45 horas a 1:50 horas, se cambió el paso de pulso de 280 x g durante 30 segundos a 100 x g durante 10 segundos paso 9, 21f, se cambió el paso de pulso de 280 x g durante 1 minuto a 100 x g durante 10 segundos paso 29, se cambió el paso de pulso de 280 x g durante 10 segundos a 100 x g durante 10 segundos, paso 36, se añadió el comentario 'repetir la agitación según el paso 35' en el paso 36 • Secciones 4.4/5.7: se ha incluido la aclaración Rango Amplio (BR) en todas las tablas de reactivos Qubit • Sección 5.3: se ha incluido el comentario de aclaración, "Retención (no supere 18 horas a 62 °C, incluido el paso n.º 4)" en la tabla del programa de hibridación • Sección 5.8: se han corregido las referencias placa/sello de TapeStation a tubos/tapas

Versión	Fecha	Modificación
		<ul style="list-style-type: none"> • Sección 6.0: se ha eliminado la tabla Esta tabla se encuentra en la Sección 1.1 • Sección 6.2: se ha cambiado el volumen total deseado de MiSeq de 100 µl a 30 µl, para que se corresponda con el cuaderno de trabajo • Sección 6.4: comentario para aclarar que solamente se cargan 20 µl del pool diluido de 100 µl en el iSeq • Sección 9: se ha añadido la exención de responsabilidad "Solamente flujo de trabajo Original" en la placa MIDI, se ha añadido hipoclorito de sodio (NaOCl) para el lavado posterior a la secuenciación • Sección 9: se han cambiado los nombres de los reactivos de MiSeq para alinearlos con los detalles de los pedidos de Illumina. Se ha añadido el kit de reactivos MiSeq Reagent v3 (600 ciclos) para AlloSeq Tx 8, se ha añadido información para pedidos de tubos Qubit y tubo/tapa/placa/film TapeStation <p>General: Se añadió ASTX17.1(24)-B-IVD en la portada. Se añadió "Tras el uso, devuélvalo a almacenamiento para pasos posteriores". Recomendaciones sobre los reactivos que deben conservarse para los pasos posteriores, errores menores de formato, gramática, puntuación y ortografía corregidos en todo el documento. Se añadió orientación adicional para 'agitar a fondo' todos los casos de uso de beads de purificación limpios tras los comentarios del equipo de campo. Se corrigieron todas las instancias de 'hybex' a 'Hybex' y 'QuBit' a 'Qubit' y 'pulse spin' a 'pulse-spin'. Se actualizó la Sección 2.2 y 4.2, en la tabla para Tampón de parada y se corrigió 'Preparación necesaria' a 'Ninguna preparación necesaria'. Se añadió "importado por" y el símbolo según ISO 15223-1-2021 e IVDR. Reeditado por L. Langley 13 Oct 21</p>
4.0	N/D	Versión 4.0 no editada.
5.0	28Jan22	Se corrigieron errores de gramática. Se corrigió la declaración de limitaciones sobre la cuantificación de los controles. Se corrigieron las características de rendimiento para que coincidan con el prospecto. Se realizaron correcciones en respuesta a ZD-2445. Sobre la base de la evaluación sumativa, se actualizaron los pasos 8, 12 y 18 de la sección 2.3 y el paso 7 de la sección 4.3, añadiendo detalles sobre la mezcla de beads de tagmentación y beads de purificación. Se actualizó el contenido de la caja para reflejar la configuración actualizada del kit CR2020-096 (SCN 2021-08-13).
	31Mar22	Se añadió Tx 17 (96) Conjunto A y B a los códigos de producto, Contenido genético dirigido, Contenidos del kit. Se añadió un detalle en IFU con instrucciones para el uso del índice de preplaca, en particular en las secciones 2.2 y 4.2. Editada por E. Naughton el 27 Abr 22
6.0	13Jun22	Se añadió Tx 9 (96) Conjunto A y B a los códigos de producto, Contenido genético dirigido y uso previsto. Se eliminó ™ del logotipo de AlloSeq Tx. Se corrigieron los valores OD en Sustancias interferentes. Se unificó la redacción entre el cuaderno de trabajo y la IFU. Sección 5.2, punto 12; cambiar volumen de etanol de 200 µL a 800 µL. Sección 10: Incorporación de los requisitos de información de vigilancia. Reeditado por Hira Meraj 26-Jul-22
7.0	25Jan23	Fecha de actualización de copyright. Detalle adicional al principio 1.1, eliminar la información duplicada. Sección 1.3 actualizar la tabla para reflejar los estudios de verificación realizados por CareDx. Sección 1.4 eliminar "se están realizando estudios acelerados". Actualizar la sección 1.6 Requisitos de la muestra; eliminar el hisopo bucal, añadir el tipo de muestra, la estabilidad de la muestra y los métodos de extracción del ADN. Actualizar la sección 1.7 -Añadir "especificidad analítica" al encabezado de la sección, añadir claridad sobre el EDTA como sustancia interferente. Secciones 1.9 y 1.10, eliminar la información no requerida. Eliminar "límite de detección" (información añadida a la sección 1.6 Requisitos de las muestras". Actualizar la sección 9 con otros parámetros del termociclador para su uso con el ensayo Tx.



AlloSeq Assign

Instrucciones de uso

IFU094

Número de versión del software: 1.0.4

N.º de versión del documento: 7.0

Fecha de edición: Febrero de 2023

REF ASA1.0

IVD

CE



CareDx Pty Ltd,
20 Collie Street,
Fremantle, WA 6160,
Australia

EC **REP**

Qarad BV,
Cipalstraat 3,
2440 Geel,
Bélgica

 **CareDx**[®]
CareDx Pty Ltd

© 2020-23 CareDx, Inc. Todas las marcas de servicio o las marcas comerciales son propiedad o se utilizan con licencia de CareDx, Inc. o sus filiales. Todos los derechos reservados.



CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Arnaboldi
M.P. 15533 - M.N. 13795
Dirección Técnica



Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

Índice

Capítulo 1: Introducción	3
Consulte IFU095_AlloSeq Tx IFU CE IVD para obtener más detalles sobre los kits de reactivos AlloSeq Tx asociados.	3
Uso previsto	3
Bases de datos de referencia	3
Características de rendimiento	4
Limitaciones	4
Capítulo 2: Requisitos informáticos y compatibilidad	6
Sistema operativo y software informático	6
Resolución de pantalla	6
Formatos de archivo de datos compatibles	6
Compatibilidad retroactiva con configuraciones anteriores	6
Capítulo 3: Instalación	6
Capítulo 4: Inicio	7
Capítulo 5: Navegación por la interfaz	9
Menú Archivo	9
Pestaña Inicio	9
Panel de muestras	11
Asignar referencias	12
Muestras y locus	12
Jerarquía de revisión	12
Opciones del panel de muestras	13
Navegador	13
Navegación básica	13
Navegación avanzada	14
Selección de base	14
Lista de discrepancias	14
Detalles de indel	14
Posición de nucleótidos por regiones o grupos	15
Vistas	16
Resumen	16
Panel Resumen de tipificación	16
Motivos de la secuencia	17
Panel Resumen de calidad	17
Panel Resumen de cobertura	17
Resumen de genes	18
Vista Cobertura	19
Gráfico de confianza, Estructura de locus y Visualización del bloque de fase	19
Panel Secuencias	20
Sección Secuencias	20
Vista Lecturas	27
Vista Alineación y vista Referencia	28
Capítulo 6: Generación de informes	29
Tipos de informes	29
Capítulo 7: AlloSeq Assign Launcher	35
Capítulo 8: Glosario	36
Capítulo 9: Asistencia y datos de contacto	39
Capítulo 10: Historial de revisiones	40

Capítulo 1: Introducción

El software AlloSeq Assign (a partir de ahora descrito como "Assign") y AlloSeq Tx, un kit de secuenciación NGS de captura híbrida dirigida, constituyen en conjunto un sistema para el genotipado de genes que son importantes en la compatibilidad de los trasplantes. Estos genes incluyen los genes de la región MHC. Assign importa los datos de la secuencia desde los archivos fastq.gz generados por un instrumento de secuenciación de Illumina, crea una secuencia de consenso por locus para una muestra, permite la revisión y la edición de la llamada de las bases y compara la secuencia de consenso con una librería de secuencias de alelos de referencia. El software enumera los alelos mejor emparejados para ayudar al usuario a asignar un genotipo.

Assign tiene las siguientes características y funcionalidades:

- Importa secuencias de múltiples muestras y múltiples locus por muestra en una interfaz fácil de usar
- Permite visualizar los identificadores de las muestras, los encabezados de los locus, las lecturas de la secuencia, las llamadas de las bases y las asignaciones de los alelos
- Un registro de auditoría de análisis completo
- Permite el análisis de los datos de los exones solamente o de los exones + no codificantes
- Genera informes que incluyen los alelos CWD, los grupos G y los grupos P.
- Datos de secuencias de fin de fase emparejado de librerías AlloSeq secuenciadas en el sistema de secuenciación de Illumina

Consulte IFU095_AlloSeq Tx IFU CE IVD para obtener más detalles sobre los kits de reactivos AlloSeq Tx asociados.

Uso previsto

El uso previsto del software Assign es ayudar al usuario a asignar un genotipo tras el enriquecimiento selectivo y la secuenciación utilizando los kits de reactivos AlloSeq Tx. El software Assign importa los datos de la secuencia, realiza la alineación de la secuencia, permite la edición de la secuencia y luego compara una secuencia de consenso con una librería de secuencias de alelos.

El producto está diseñado para ser utilizado por laboratorios debidamente regulados.

El software es para uso profesional únicamente y no debe utilizarse como única base para tomar decisiones clínicas. Los kits AlloSeq Tx y el software no se utilizan para el diagnóstico de enfermedades.

Bases de datos de referencia

Assign compara una secuencia de la muestra con una librería de secuencias de las bases de datos de referencia. Assign utiliza las bases de datos de IMGT/HLA para ayudar al usuario a asignar genotipos a las secuencias.

Base de datos IMGT/HLA

La base de datos IMGT/HLA incluye secuencias aprobadas por el Comité de Nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para los factores del sistema HLA. La base de datos IMGT/HLA forma parte del proyecto internacional ImMunoGeneTics (IMGT) (www.imgt.org).

CWD/CIWD

La base de datos CWD/CIWD recoge los alelos comunes, intermedios y bien documentados (CIWD). Consulte la sección Anotaciones para obtener más información.

Características de rendimiento

Se pueden analizar 24 muestras en menos de 30 minutos utilizando un ordenador con unos requisitos informáticos mínimos. Consulte la siguiente tabla para conocer el rendimiento del tiempo de importación para diferentes especificaciones de PC. Nota: Estos tiempos se proporcionan únicamente como una guía y pueden variar según la calidad de la muestra y otros procesos que se ejecuten en el ordenador.

Especificaciones del PC	Ensayo	N.º de muestras	Tiempo medio de importación
64 GB de RAM, procesador i7, 3,4 GHz	AlloSeq Tx	96	16 minutos
64 GB de RAM, procesador i7, 3,4 GHz	AlloSeq Tx	24	7 minutos
32 GB de RAM	AlloSeq Tx	96	40 minutos
32 GB de RAM	AlloSeq Tx	24	7 minutos
16GB de RAM	AlloSeq Tx	96	40 minutos

Limitaciones

Secuenciación con tecnología de secuenciación de lectura corta (short read) de secuenciadores de Illumina

AlloSeq Tx se ha optimizado para los secuenciadores de Illumina (ver IFU). La secuenciación de Illumina es una plataforma de secuenciación de "lectura corta" que secuencia 150 pb de ambos extremos de un fragmento de ADN que suele tener 500 pb de longitud. Para determinar si dos polimorfismos están en fase, la distancia entre estos polimorfismos debe estar dentro de la longitud de los fragmentos de ADN que se secuencian. Los polimorfismos fuera de esta región no estarán en fase. La incapacidad de determinar la fase aumenta el riesgo de un informe que incluya una ambigüedad heterocigótica. Un informe que enumera solo un genotipo cuando la secuencia genética no ha sido completamente en fase refleja el número limitado de alelos en la librería de referencia. Un par de alelos alternativos, aún por describir, puede tener la misma secuencia de consenso y, de hecho, puede ser la respuesta correcta.

Limitaciones de los ensayos de captura híbridos para el tipaje de HLA/comparación genética de MHC

El MHC ha evolucionado tras la replicación y la diversificación de secuencias genéticas que incluyen HLA y otras secuencias. En consecuencia, el MHC contiene numerosos genes homólogos. Las sondas biotiniladas capturan fragmentos de secuencia que son hasta un 20% diferentes de los loci objetivo, por lo que se capturan muchas secuencias no específicas. Assign filtra estas lecturas y las asigna al gen correcto. Sin embargo, en algunos casos, las lecturas se asignan al gen equivocado. Nuestra experiencia es que este problema es poco frecuente y, cuando ocurre en tal medida que la asignación incorrecta de las lecturas afecta al análisis, el informe de comparación no puede encontrar una coincidencia perfecta entre la secuencia de consenso de muestra y la librería de referencia.

Tenga en cuenta que la asignación incorrecta de lecturas puede ser un síntoma de una especificidad reducida del ensayo causada por condiciones de ensayo subóptimas. Póngase en contacto con el equipo de soporte técnico si sospecha que existe este problema.

Un genetista de trasplante comprenderá que, aunque se han realizado pruebas exhaustivas, la naturaleza increíblemente diversa del MHC significa que no se pueden probar todos los escenarios y, como en todos los ensayos de tipaje de HLA, los artefactos específicos de la muestra pueden complicar el análisis y la asignación de un tipo de HLA.

Limitaciones de la base de datos IMGT/HLA

Como se ha descrito anteriormente, Assign compara la secuencia de muestra con las secuencias de alelos de la base de datos IMGT/HLA y enumera los pares de alelos que mejor coinciden. La base de datos IMGT/HLA se actualiza con secuencias de alelos recién descritos cada tres meses, y los alelos mejor emparejados son relevantes solamente para la base de datos utilizada en ese momento. CareDx publicará archivos de referencia de Assign actualizados cada seis meses.

Se requiere que un experto en el campo de la genética de trasplantes/tipaje de HLA interprete estos datos para proporcionar el tipo de HLA más probable. Un experto comprenderá la limitación de la base de datos de secuencias de referencia.

No todos los alelos HLA reconocidos se han secuenciado en la misma medida. Todos los genes clásicos de HLA clase I han sido secuenciados en los exones 2+3, algunos han sido secuenciados en el exón 2+3+4, algunos tienen una secuencia de codificación completa y otros tienen una secuencia genética completa (según la definición del comité de nomenclatura de la OMS). Por lo tanto, un día puede cambiar el nombre de un tipo de HLA asignado a partir de una secuencia de referencia limitada, ya que las variantes se identifican en regiones que no se secuenciaron originalmente. Un ejemplo clásico es DRB1*14:01. DRB1*14:01 se definió por secuencia en el exón 2 del HLA-DRB1. Los investigadores secuenciaron el exón 2+3 y notaron que un polimorfismo en el exón 3 dividió DRB1*14:01 en DRB1*14:01 y DRB1*14:54. Se determinó que el alelo recién nombrado DRB1*14:54 era el más común de los 2 alelos en todas las poblaciones donde se identificó DRB1*14:01. Por lo tanto, muchas muestras originalmente genotipadas como DRB1*14:01 de la secuencia del exón 2 ahora pueden ser reconocidas como mal genotipadas. Es posible que los donantes y los pacientes que se consideran emparejados para DRB1*14:01 sean de hecho no emparejados. Se desconocen las implicaciones de esta situación.

Lo más cercano que podemos llegar a un tipo de HLA preciso es informar de 2 alelos x que están completamente en fase en todo el gen y que los alelos de referencia también se secuencien en todo el gen. Sin embargo, esto sigue estando restringido por los límites arbitrarios de los genes definidos por el comité de nomenclatura de la OMS y la falta de una definición de dónde comienza y termina un gen. Todavía es posible que existan variantes más allá de los límites.

Tipaje en cuatro campos de genes de clase 2

Nota: La cobertura de intrones es incompleta para DPA1, DPB1, DQA1, DQB1, DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5. La información de alelos de estos genes con una resolución de cuatro campos puede producir resultados que no concuerden con los genotipos derivados de la secuenciación completa del gen. Además, los alelos que no tienen una secuencia intrónica publicada en la base de datos IMGT pueden ser promovidos en la tabla de resultados, mientras que los alelos similares que han sido completamente caracterizados se enumeran más abajo en la tabla.

Limitaciones generales

Assign se valida para su uso con datos de secuencia generados por los productos de AlloSeq Tx secuenciados en instrumentos validados. No se debe utilizar Assign para analizar los datos generados de ninguna otra forma. Los datos de mala calidad, incluidas las secuencias de consenso con ruido de fondo o una profundidad de cobertura de secuencia baja, pueden dar lugar a llamadas de la base de consenso incorrectas y a un tipaje incorrecto. Assign incluye una interfaz visual sencilla para ver la calidad de lectura y la profundidad de la cobertura de secuenciación, lo que permite identificar rápidamente la mala calidad de lecturas y la baja profundidad de la cobertura de secuencia.

Assign alinea las lecturas de secuencia de un archivo fastq de ejemplo con la secuencia de consenso construida a partir de la base de datos IMGT para cada locus en cuestión. Para facilitar una alineación precisa, los alelos de los locus DRB1 se han dividido en diferentes grupos según las similitudes intrónicas (para obtener más información, consulte las secciones *Secuencia de consenso de locus* y *Panel de resumen de cobertura*). Por lo tanto, una muestra puede tener alelos DRB1 pertenecientes a dos grupos diferentes de DRB1 o puede tener dos alelos pertenecientes al mismo grupo de DRB1 o puede ser homocigota teniendo así dos copias del mismo alelo. Del mismo modo, el hecho de que la muestra contenga alelos para HLA-DRB3, -DRB4 o -DRB5 dependerá del haplotipo que lleve la muestra y, como tal, la muestra no puede contener alelos HLA-DRB3/DRB4/DRB5 en absoluto, puede tener un alelo para un locus, dos alelos para un solo locus o dos alelos para distintos locus. En los casos en los que haya un solo alelo para un locus, si la casilla de verificación Duplicar homocigotos está seleccionada en las opciones de informe, el software informará de dos copias del mismo alelo.

Por lo tanto, se recomienda tener precaución al interpretar el informe de genotipo como un tipo de HLA.

Capítulo 2: Requisitos informáticos y compatibilidad

Para garantizar un rendimiento óptimo, utilice los siguientes requisitos informáticos mínimos:

- Procesador Intel quad-core 64 bits de 1 GHz o superior, o equivalente
- 16 GB de RAM como mínimo
- 16 GB de espacio disponible en el disco duro

Los archivos de datos de secuencia se pueden almacenar localmente o en una ubicación de red. En función del rendimiento de la red, el software puede experimentar un retraso significativo en el procesamiento mientras se importan archivos desde una ubicación de red.

Sistema operativo y software informático

Assign se ejecuta en Windows y está validado para los sistemas operativos Windows 10 o Windows Server 2012. Assign no es compatible con las siguientes versiones de Windows: Embedded (incluido Windows en el sistema de secuenciación de Illumina), RT, Starter, Mobile y Phone, o cualquier hardware que no admita un teclado, ratón y monitor estándar. Se requiere Microsoft Excel 97 o posterior para generar informes de Excel desde Assign.

Resolución de pantalla

La resolución de pantalla recomendada es de 1920 x 1080 píxeles. Utilice varios monitores o aumente la resolución de pantalla en el monitor para ampliar el número de campos visibles para cada locus.

Formatos de archivo de datos compatibles

Assign es compatible con el formato de archivo FASTQ, ya sea comprimido (*.fastq.gz) o descomprimido (*.fastq). El sistema de secuenciación de Illumina genera estos formatos de archivo. Para obtener más información sobre el formato de archivo FASTQ, por ejemplo, consulte la Guía de referencia de flujo de trabajo de generación de FASTQ MiSeq Reporter (documento n.º 15042322).

Compatibilidad retroactiva con configuraciones anteriores

El instalador de AlloSeq Assign v1.0.4 incluye el archivo de configuración Tx17.1 v1.0.2 y Tx17.1 v1.0.3 para permitir a los usuarios abrir proyectos guardados con configuraciones anteriores de AlloSeq Assign. Debido a las diferencias en la forma en que el algoritmo maneja los indels entre versiones, al reabrir un proyecto analizado previamente con ajustes anteriores de AlloSeq Assign, existe la posibilidad de que algunas inserciones se denominen como no coincidentes. Esto puede rectificarse haciendo clic con el botón derecho en el locus impactado y seleccionando Reanalyse.

Si un usuario selecciona la configuración Tx17.1 v1.0.1 o importa un proyecto analizado previamente con la configuración Tx17.1 v1.0.1 a AlloSeq Assign v1.0.4 y selecciona 'Default' en la lista desplegable de campos, se mostrarán capas sin codificación para todos los locus.

Capítulo 3: Instalación

CareDx recomienda el acceso del administrador al equipo antes de instalar Assign. Asegúrese de que el equipo está conectado a Internet para facilitar las actualizaciones del sistema con nuevas librerías y otros archivos cuando sea necesario.

1. Haga doble clic en el archivo de instalación (*.msi) y siga las instrucciones para instalar el software.
2. Lea el Contrato de licencia.

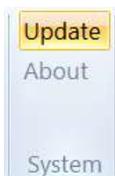
3. Si acepta los términos del Contrato de licencia, haga clic en **Next** para continuar.
4. Seleccione la ubicación de la carpeta de instalación. CareDx recomienda que acepte la ubicación por defecto. Haga clic en **Next**.
5. Seleccione las opciones de acceso directo y, a continuación, haga clic en **Next**.
6. Haga clic en **Install** para comenzar la instalación.
7. Una vez finalizada la instalación, haga clic en **Finish**.

Capítulo 4: Inicio



1. Haga doble clic en el icono Assign del escritorio o en la ubicación de instalación.
2. En el cuadro de diálogo Inicio de sesión del operador, seleccione el operador en la lista desplegable. El operador por defecto es **admin**.
3. Introduzca la contraseña. La contraseña por defecto para el operador administrador es **cg01**.
4. Haga clic en **Sign in** para iniciar el software.

Agregar licencia



1. En el grupo Sistema, haga clic en **Update**.
2. Busque el archivo de licencia de Assign suministrado por CareDx y, a continuación, haga clic en **Open**.
3. Haga clic en **Listo** y, a continuación, reinicie el software.
4. Las licencias también se pueden guardar en la carpeta de instalación del software.

NOTA: Las claves de licencia se proporcionan con un periodo de tiempo fijo (por ejemplo, 6 meses).

Para obtener una nueva clave de licencia, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de CareDx.

Agregar operadores

1. Haga clic en **More** para expandir el cuadro de diálogo Inicio de sesión del operador y acceder a la sección Editar usuarios.
2. En el campo **Edit Operator**, introduzca un nuevo nombre de operador.
3. Introduzca una contraseña para el nuevo operador y vuelva a escribir la misma contraseña para su verificación.
4. En la lista desplegable **Default Settings**, seleccione el archivo de configuración adecuado para el ensayo utilizado.
5. Seleccione este ajuste para todos los operadores que analicen los datos de AlloSeq Tx. Los operadores con privilegios suficientes pueden modificar los ajustes directamente en Assign.
6. En la lista desplegable **Nivel de operador**, seleccione una de las opciones que se muestran en la tabla siguiente.
7. Haga clic en **Add/Update**.

Permisos de nivel de operador:

	<i>Primer revisor (solo edición)</i>	<i>Primer revisor (con acceso a los ajustes)</i>	<i>Revisor final (con acceso completo)</i>
Puede cambiar los ajustes	No	Sí	Sí
Puede editar secuencias que aún no han sido aprobadas por un revisor final	Sí	Sí	Sí
Puede firmar la casilla de verificación de revisión final	No	No	Sí

Actualización de Referencias

CareDx proporciona referencias actualizadas dos veces al año que se pueden descargar del sitio web de CareDx. Los usuarios deben actualizar de acuerdo con la frecuencia determinada por sus requisitos normativos locales. Para actualizar:

- 1 Guarde los archivos y descomprímalos en el escritorio o en una ubicación de red.
- 2 Después de iniciar sesión y agregar operadores, seleccione **Update** en el menú **System** de la cinta.
- 3 Haga clic en Referencias y CWD.
- 4 Seleccione todos los archivos de referencia y haga clic en **Open**.
- 5 Seleccione todos los archivos CWD y haga clic en **Open**.
- 6 Después de importar las nuevas referencias y CWD, cierre el software y vuelva a iniciarlo, seleccione el nuevo archivo CWD en la lista desplegable y haga clic en **Update**.
- 7 A continuación, se aplicarán las nuevas referencias y los archivos CWD.

Actualización de códigos NMDP [Opcional]

Los códigos NMDP compatibles con Assign se pueden descargar en <https://hml.nmdp.org/mac/files/numer.v3.zip>

Para actualizar:

- 1 Guarde los archivos y descomprímalos en el escritorio o en una ubicación de red.
- 2 Haga clic con el botón derecho del ratón en el archivo y seleccione Rename.
- 3 Elimine el.v3 del nombre de archivo y guarde el archivo.
- 4 Inicie sesión en Assign y seleccione **Update** en el menú **Sistema** de la cinta.
- 5 Haga clic en **NMDP Codes**.
- 6 Seleccione el archivo y haga clic en **Open**.

Importar y analizar secuencias

La importación de secuencias puede tardar de minutos a horas, según el número de archivos importados y el rendimiento del sistema informático. Durante la importación, Assign no está disponible y la barra de título de la aplicación indica que el software no responde. El software responde una vez completados la importación y el análisis. La primera importación tarda un poco más en analizarse después de la instalación inicial y después de una actualización de referencia debido a la actualización simultánea de los archivos del sistema.

Después de importar secuencias en Assign, el análisis comienza automáticamente. El análisis incluye la alineación de las lecturas, la llamada de las bases de consenso, la fase y una comparación de la secuencia de consenso con la librería de referencia.

Errores de importación

Los nombres de archivo de muestra FASTQ suelen tener el siguiente formato:

nombre_de_muestra-HLA-fecha_S1.FASTQ.gz

(Por ejemplo, 00001234-HLA-04262016_S5_L001_R1_001.fastq.gz, 00001234-HLA-04262016_S5_L001_R2_001.fastq.gz)

La parte "-HLA-" del nombre de la muestra es fundamental para la identificación y el análisis en Assign.

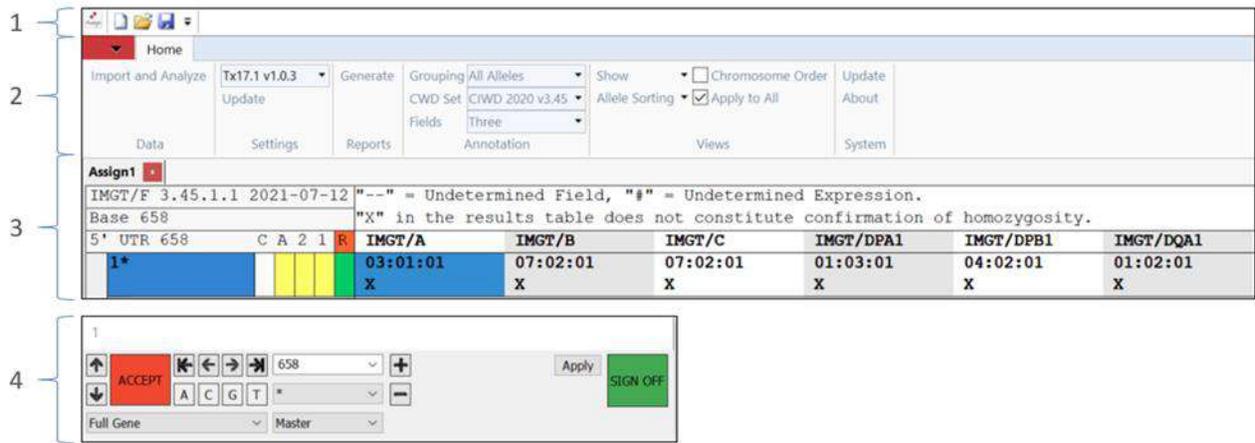
Una vez finalizado el análisis de las secuencias importadas, aparece cualquiera de las siguientes advertencias para indicar que los archivos no se han importado correctamente:

- No hay identificador/delimitador de muestra
- No hay guiones (-) en el nombre de archivo como se esperaba.
- No hay caracteres adecuados antes del primer guión para nombrar la muestra.
- No se ha identificado ningún objetivo/delimitador (es decir, falta de HLA).
- No se pueden combinar uno o varios archivos finales emparejados.
- Solamente se ha importado una sola lectura para una o varias muestras.

CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Arnaboldi
M.P. 15633 - M.N. 13795
Dirección Técnica

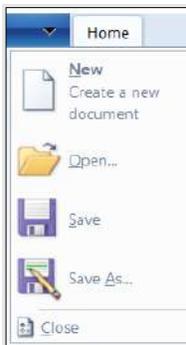
Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

Capítulo 5: Navegación por la interfaz



- 1 File menu:** permite crear secuencias nuevas, abrirlas y guardarlas en Assign.
- 2 Home tab:** permite cambiar la configuración y las vistas.
- 3 Sample panel:** enumera las muestras de un proyecto y realiza un seguimiento de los comentarios del revisor y de los análisis del laboratorio. Para obtener más información, consulte *Panel de muestras*.
- 4 Navigator:** le ayuda a navegar hasta las posiciones base de interés. Para obtener más información, consulte *Navegador*.

Menú Archivo



El menú Archivo se encuentra a la izquierda de la pestaña Inicio (Home). Haga clic en la flecha hacia abajo para abrir el menú Archivo (File). Utilice el menú Archivo para crear, abrir y guardar proyectos nuevos.

Haga clic en **Save** o **Save as** para guardar las lecturas alineadas, la secuencia de consenso de muestra y las ediciones del usuario.

Se recomienda guardar los proyectos regularmente como mejor práctica.

Pestaña Inicio

La pestaña Inicio (Home) se divide en los siguientes grupos: Datos (Data), Ajustes (Settings), Informes (Reports), Anotaciones (Annotation), Vistas (Views) y Sistema (System).



Datos

El grupo Datos (Data) permite importar y analizar datos de secuencia.

- 1 Haga clic en una pestaña de documento abierta para elegir el destino de importación. Para crear un documento, haga clic en el botón Archivo (File) y seleccione **New** o presione **Ctrl+N**. En el grupo Datos, haga clic en **Import and Analyse**.
- 2 Desplácese a la carpeta que contiene los archivos FASTQ.
- 3 Utilice la tecla Ctrl para seleccionar archivos individuales o la tecla Mayúscula para seleccionar un grupo de archivos que desee importar y analizar. Utilice Ctrl + A para seleccionar todos los archivos de una carpeta. El cuadro de búsqueda situado en la parte superior derecha del cuadro de diálogo de importación también se puede utilizar para buscar una muestra o un locus concreto para el análisis.
- 4 Haga clic en **Open** para iniciar la importación y el análisis.

NOTA: Cada ejemplo genera un archivo FASTQ para Lectura 1 y Lectura 2. Asegúrese de seleccionar ambos archivos FASTQ.

Para un análisis óptimo, los archivos FASTQ de Lectura 1 y Lectura 2 se importan y analizan simultáneamente.

Ajustes

Settings permite la selección de archivos que contienen diferentes parámetros de análisis e informes. Es posible que este menú no contenga opciones de cambio. Al hacer clic en **Update**, se guardarán las opciones de visualización actuales como opciones por defecto, incluidos el panel actual, el número de campos y el conjunto de CWD.

NOTA: Cuando se utilizan archivos de configuración para versiones anteriores a la v1.0.3 con la v1.0.3 y posteriores, las muestras se analizarán con los genes capturados con el ensayo de AlloSeq Tx

Informes

El grupo Informes (Reports) le permite generar:

- Genotipado y datos de secuencia en formato FASTA.
- Los formatos de archivo de informe de genotipado son texto, Excel o XML.
- El informe Análisis de fragmentos.
- El informe HML.

Para obtener más información, consulte *Generación de informes*.

Anotaciones

El grupo Anotaciones (Annotation) le permite ver e informar sobre las coincidencias de genotipo como:

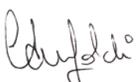
- **G Groups:** consolida la lista del panel Resultados en G Groups.
- **P Groups:** consolida la lista del panel Resultados en P Groups.
- **All Alleles:** muestra todas las coincidencias de alelos en el panel Resultados (Results).

El **CWD Set** muestra los alelos comunes, intermedios y bien documentados (CIWD) en negrita en el panel Resultados. Los archivos CIWD se generan a partir de una combinación de la versión 3.0.0 del catálogo CIWD¹ y la 2.0.0 del catálogo CWD², y son editables para reflejar los alelos CIWD en su población. Los archivos CIWD se actualizan cada seis meses con la versión de referencia de IMGT para incluir todos los alelos que se han actualizado, lo que da como resultado una división de alelos. Los archivos CIWD se pueden editar abriendo los archivos incluidos en cada versión de referencia con un editor de texto como el Notepad. El archivo cat 1 contiene los alelos comunes e intermedios, el archivo cat 1-2 contiene alelos comunes, intermedios y bien documentados.

Importante: Dado que los archivos CIWD pueden ser modificados por el usuario para incluir alelos específicos de la población, CareDx no acepta ninguna responsabilidad por la integridad de estos archivos CIWD una vez que se hayan

¹ Hurley, CK, Kempenich, J, Wadsworth, K, et al. Common, intermediate and well-documented HLA alleles in world populations: CIWD version 3.0.0. HLA. 2020; 95: 516– 531. <https://doi.org/10.1111/tan.13811>

² Mack et al. Common and well-documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue. *Tissue Antigens*, 81:194-203, March 20, 2013.



CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Arnaboldi
M.P. 15633 • M.N. 13795
Dirección Técnica

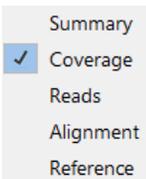


Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

descargado del sitio web de CareDx. La lista desplegable **Fields** permite limitar la vista de los alelos de la lista de resultados al número de campos especificado. Si selecciona **Máximo** (Maximum), la secuencia utilizada para el tipaje se amplía automáticamente a la cobertura máxima para todos los loci. Cuando se reduce el número de campos, los alelos pueden aparecer varias veces en la tabla de resultados. Pueden producirse pares de alelos idénticos porque hay diferencias de 3.º o 4.º campo con diferencias de mismatch resultantes. Si selecciona **Default** y está marcada la opción **Aplicar a todo** (Apply to all), los loci de Clase I se mostrarán en 4 campos, la Clase II en 3 campos y MIC en 2 campos.

Vistas

El grupo Vistas (Views) permite navegar entre los paneles para ver los datos de secuencia de diferentes maneras. Utilice la lista desplegable **Mostrar** (Show) para elegir la vista **Resumen** (Summary), **Cobertura** (Coverage), **Lecturas** (Reads), **Alineación** (Alignment) o **Referencia** (Reference).



Resumen consta de 4 paneles:

- Panel de resumen de tipaje (Typing Summary): muestra los genotipos asignados.
- Motivos (Motifs)
- Panel de resumen de calidad (Quality Summary): muestra el porcentaje de llamadas de las bases con calidad \geq Q30.
- Panel de resumen de cobertura (Coverage Summary): muestra la profundidad media de la cobertura de secuenciación.

Cobertura muestra la cobertura media y la composición de la llamada de las bases en todo el amplicón.

Lecturas muestra las lecturas utilizadas en la llamada de las bases.

Alineación es una comparación de la Secuencia de consenso de muestra y los pares de alelos del panel Resultados (Results).

Referencia es una comparación de la Secuencia de consenso de muestra y las secuencias de referencia de un locus.

La lista desplegable **Clasificación de alelos** (Allele Sorting) permite ordenar el panel Resultados por alelos con la mayor cobertura de secuencia de referencia (los alelos que tienen secuencia de genes completa se enumeran con prioridad sobre los alelos que solo tienen exones completos o limitados), o por el número de mismatches.

Sistema

El grupo Sistema (System) permite actualizar y ver información dentro del software Assign. Haga clic en **Update** para abrir un cuadro de diálogo que permite importar claves, referencias, códigos NMDP y archivos CWD. Haga clic en **About** para abrir un cuadro de diálogo que proporciona la versión del software y la información de licencia.

Panel de muestras

El panel de muestras visualiza los nombres de las muestras, los loci secuenciados para cada muestra, la versión de referencia IMGT/HLA y el estado de la revisión para cada locus.

- **Columna R:** un cuadro verde en la columna R indica que el locus está incluido en los informes generados. Haga clic en el cuadro para que se vuelva rojo y evitar la generación de informes en el locus.

Opciones del panel de muestras

Hay opciones adicionales disponibles para cualquier locus que aparezca en el panel de muestras. Para ver las opciones, haga clic con el botón derecho del ratón en el nombre de un locus. Están disponibles las siguientes opciones:

- **Show Comments:** muestra cualquier advertencia de calidad o comentario sobre un locus de muestra.
- **Edit Comments:** abre un campo para añadir o editar comentarios sobre la muestra seleccionada. Estos comentarios aparecen en el informe. Un cuadro azul claro en la columna C indica la existencia de un comentario.
- **Reanalyse:** elimina las ediciones y recortes realizados en el locus seleccionado.
- **Remove:** elimina el locus seleccionado del proyecto.

Navegador

Utilice el navegador para navegar a una posición base de interés, confirmar llamadas de bases o realizar ediciones de llamadas de bases. Puede arrastrar el navegador a cualquier lugar de la pantalla.

Navegación básica

Icono de navegación	Descripción
	Haga clic en las flechas arriba y abajo para desplazarse entre los loci del panel de muestras.
	Haga clic en Accept para confirmar una llamada de base en una posición específica. Haga clic en Reject para cambiar una llamada de base aceptada previamente.
	Utilice las flechas anterior y siguiente para desplazarse entre las posiciones que se van a auditar.
	Utilice las flechas primera y última para desplazarse hasta la primera y última posiciones de las bases.
	Haga clic en Sign Off para confirmar que la revisión ha finalizado. Si no quedan posiciones por revisar, aparecerá este botón. Una vez que el primer revisor haya seleccionado Sign Off, la 1.ª columna de revisión de la jerarquía de revisión cambiará automáticamente a verde y el software pasará automáticamente al siguiente gen del proyecto.
	Haga clic en Apply para desplazarse a una posición o interés.

Navegación avanzada

Sample1

9589

ACCEPT

A C G T C

Apply

SIGN OFF

Full Gene

Master

Full Gene

5' UTR

Exon 1

Intron 1

Exon 2

Intron 2

Exon 3

Intron 3

Exon 4

Intron 4

Exon 5

Intron 5

Exon 6

3' UTR

- A Selección de base
- B Posición de nucleótido activo y/o lista de mismatches
- C Selección de inserción y eliminación
- D Detalles de inserción
- E Aplicar inserción
- F Sign Off
- G Cambio de campo de posición de nucleótido
- H Selección de capas

Selección de base

La base resaltada indica la llamada de la base en la posición actual. Varias bases resaltadas indican que se ha identificado positivamente más de una base en la posición actual. Una resaltada indica una inserción. Una resaltada indica una eliminación.

1. La edición de llamadas de la base se realiza agregando o eliminando una base en la posición activa que sea coherente con la llamada de la base de consenso juzgada por el operador. Esto se realiza haciendo clic en **A**, **C**, **G** o **T**, **+** o **-**, o seleccionando en la lista desplegable de selección de base.
2. Haga clic en **Accept** para aceptar la base seleccionada y pasar a la siguiente posición de confianza baja. Consulte en *Indicadores de confianza* los criterios de posiciones de baja confianza.
3. Si desea cambiar una llamada de base aceptada previamente, haga clic en **Reject** para activar la edición.

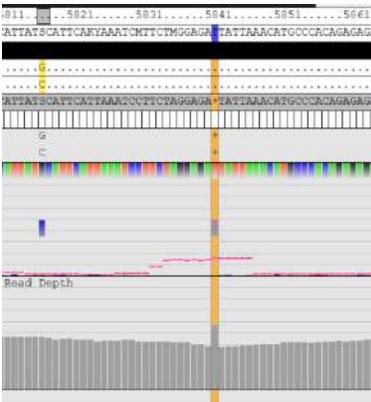
Lista de mismatches

La lista de mismatches muestra la posición seleccionada. Seleccione la flecha hacia abajo para mostrar todas las posiciones de mismatch para el par de alelos seleccionados en las columnas de mismatch activas. Para mover el cursor a una posición seleccionada, introduzca un número en el campo Posición de nucleótido y haga clic en **Apply** o seleccione una opción de la lista para desplazarse a esa posición.

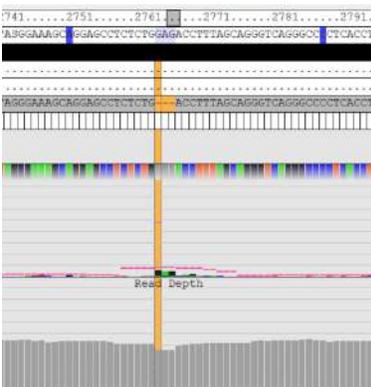
Detalles de indel

En una posición en la que haya una inserción o una eliminación, el cuadro **+** (inserción) o **-** (eliminación) correspondiente se resalta en azul. La longitud de la inserción y las bases incluidas en ella se indican junto a los símbolos. Las bases insertadas se pueden editar en el cuadro y guardarse haciendo clic en **Apply** en el navegador.

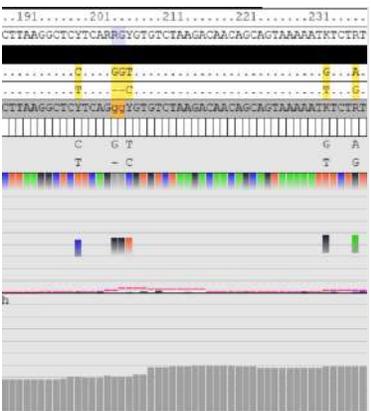
Las inserciones y las eliminaciones se representan en la secuencia de consenso de la siguiente manera:



Una inserción se representa mediante un signo + en la secuencia de consenso de muestra. La(s) base(s) insertada(s) cae(n) directamente antes del +. En el navegador, la secuencia insertada se puede ver en el cuadro de texto. Cuando ambos alelos tengan una inserción en la misma posición, utilice el cuadro desplegable para ver la secuencia insertada de ambos alelos.



Una eliminación homocigota se representa mediante – en la secuencia de consenso de muestra. El signo – indica que un alelo homocigoto tiene una eliminación o que ambos alelos de una muestra heterocigota tienen la eliminación. Cuando hay una eliminación en ambos alelos, la eliminación no se mostrará en la capa de fase.



Una eliminación heterocigota se representa mediante letras minúsculas en la secuencia de consenso de muestra, lo que indica que un alelo tiene la eliminación y un alelo no. Solo la primera posición de la eliminación aparecerá en la capa de fase. Las eliminaciones solo contarán para una mismatch en la capa de análisis.

Posición de nucleótidos por regiones o grupos

- La numeración por defecto comienza en la primera base del gen. Utilice la lista desplegable para ver el sistema de numeración según la región o el grupo.
- **Gen completo:** posición en la secuencia génica basada en la secuencia de consenso del locus.
- **Regiones:** para una posición de interés determinada, elija la región del gen, introduzca la posición relativa en la lista de mismatches y, a continuación, haga clic en **Apply**. Utilice esta función para una navegación rápida.
- **Grupos:** los grupos definen una cadena de regiones. El cDNA es un grupo de exones.

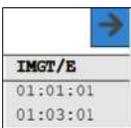
Vistas

Al hacer clic en **Show**, podrá elegir entre los paneles Resumen (Summary), Cobertura (Coverage), Lecturas (Reads), Alineación (Alignment) y Referencia (Reference).

Resumen

Los siguientes paneles de resumen están disponibles en la vista Resumen (Summary). Se accede a cada uno de ellos como ventanas únicas, siendo la ventana por defecto el resumen del tipaje.

- Panel Resumen del tipaje
- Motivos de la secuencia
- Panel Resumen de calidad
- Panel Resumen de cobertura



Para moverse entre los paneles de Resumen, pase el ratón por encima del cuadro azul de la esquina superior derecha de una vista Resumen y haga clic en la flecha azul que aparece. Esta flecha recorre los paneles de Resumen.



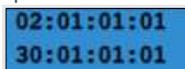
Si hay más locus de los que caben en la pantalla, pueden verse en la segunda página del panel Resumen haciendo clic en la flecha azul de la parte inferior derecha de la pantalla. Haga clic en la flecha azul de la parte inferior izquierda para volver al panel Resumen principal.

NOTA: Haga clic en Orden de cromosomas (Chromosome order) para cambiar el orden de los loci entre alfanumérico y cromosómico. Al cambiar el orden de los loci en la vista Resumen, también cambia el orden en el informe resumido. Para mantener esta configuración, haga clic en **Update** en la sección Ajustes (Settings) de la pestaña Inicio (Home).

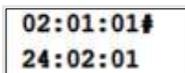
Panel Resumen del tipaje

En el panel Resumen del tipaje aparecen las muestras y los alelos mejor emparejados asignados a cada locus para cada muestra.

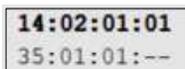
El panel Resumen del tipaje utiliza los siguientes marcadores:



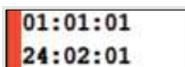
Muestra activa: un resaltado azul indica la muestra activa. Haga clic en el área resaltada para abrir la muestra y el locus en la vista Cobertura (Coverage) para una investigación adicional. Los campos completos indican un resultado de tipaje inequívoco.



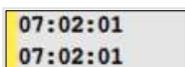
Expresión ambigua: un signo # indica una expresión ambigua en un tipaje alélico.



Campos ambiguos: un doble guión (--) indica un campo ambiguo en el resultado del tipaje. Por ejemplo, --:01 indica una ambigüedad en el primer campo, 01:-- indica una ambigüedad en el segundo campo y 01:01:-- indica una ambigüedad en el tercer campo.



Advertencia de confianza, rojo: un recuadro rojo inmediatamente a la izquierda de un par de alelos indica un locus que podría necesitar una investigación adicional. Este aviso puede indicar una calidad de lectura insuficiente, o una profundidad media de cobertura inferior a 100.



Llamadas homocigotas duplicadas, amarillo: un cuadro amarillo inmediatamente a la izquierda de un par de alelos indica que se ha marcado la casilla de llamadas homocigotas duplicadas en el cuadro de diálogo de informes y que la muestra es homocigota en el locus en cuestión. Si la casilla Llamadas homocigotas duplicadas no está marcada, el segundo alelo se mostrará como una X, como se describe a continuación. Para más información, consulte la sección Informes a continuación.

07:02:01
X

X mostrada para el segundo alelo: una X mostrada para el segundo alelo indica que no se han detectado posiciones heterocigotas en la secuencia analizada. La presencia de una X en la pantalla de resumen no constituye una confirmación de homocigosidad.

15:03:01
15:16:01

Texto en negrita: indica un alelo común y bien documentado (CIWD).

Low
Coverage

Cobertura baja: indica una muestra con muy pocas lecturas para alinearse con las referencias. Normalmente, esta advertencia aparece con los controles negativos o las muestras que no cumplen con los parámetros de calidad.

34:02:01G
68:02:01G

G-only: muestra todos los alelos de todos los loci en los que IMGT ha proporcionado la agrupación G como Grupos G. Al pulsar la combinación de teclas CTRL+G una vez, se activa esta pantalla. Para más información, consulte la sección Informes.

34:02P
68:02P

P-only: muestra todos los alelos para todos los loci en los que IMGT ha proporcionado la agrupación P como grupos P. Al pulsar la combinación de teclas CTRL+G una segunda vez, se activa esta pantalla. Para más información, consulte la sección Informes.

34:02:01
68:02:01

Default: si pulsa por tercera vez la combinación de teclas CTRL+G, se mostrarán todos los alelos para todos los loci hasta el número de campos seleccionado en las opciones de campos.

Motivos de la secuencia

La pestaña de motivos de secuencia (Sequence Motifs) dentro de la pantalla de resumen indica la presencia de motivos definidos dentro de los archivos de referencia. Los motivos indicados en esta pestaña incluyen la presencia de motivos Bw4/Bw6 en HLA-A, -B y -C, el genotipo de la posición del SNP rs9277534 de DPB1 que codifica variantes de expresión, y otras posiciones del SNP que se han determinado como importantes. La lista completa de los motivos incluidos en las referencias figura en las Notas de publicación de referencias (Reference Release Notes).

Sequence Motifs.									
IMGT/A	IMGT/B	IMGT/C	IMGT/DPA1	IMGT/DPB1	IMGT/DQA1	IMGT/DQB1	IMGT/DRB1	IMGT/DRB3	IMGT/DRB4
	Bw6	Bw6		rs9277534:AA					
Bw4	Bw4	Bw6		rs9277534:GG					
Bw4	Bw6	Bw6		rs9277534:AA					

Panel Resumen de calidad

La puntuación de calidad, o puntuación Q, es la probabilidad de una llamada de base incorrecta. Durante la secuenciación de Illumina, a cada base de una lectura se le asigna una puntuación Q. Una puntuación Q más alta indica una menor probabilidad de error. Por ejemplo, Q30, representa una probabilidad de 1 entre 1000 de que la llamada sea incorrecta, con una precisión de llamada correspondiente del 99,9%. El panel Resumen de calidad muestra el porcentaje de llamadas de la base con puntuaciones Q30 o superiores para cada locus. Aparece una advertencia de confianza para los loci cuando el porcentaje de llamadas de la base con una puntuación Q30 es del 75% o inferior.

Percent base calls with Q30 or better.									
IMGT/A	IMGT/B	IMGT/C	IMGT/DPA1	IMGT/DPB1	IMGT/DQA1	IMGT/DQB1	IMGT/DRB1	IMGT/DRB3	IMGT/DRB4
97%	96%	97%	97%	97%	97%	96%	97%	97%	

Panel Resumen de cobertura

El panel Resumen de cobertura muestra la profundidad media de la cobertura de secuenciación para cada locus del proyecto. La profundidad de la cobertura de secuenciación es el número medio de bases en cada posición secuenciada en los datos de la secuencia. Hay advertencias cuando los loci no cumplen las especificaciones de cobertura media de

100x. Si los 2 alelos de un locus están divididos entre 2 grupos (por ejemplo, DRB1*01 y DRB1*03), aparece una advertencia cuando el grupo no cumple las especificaciones de 50x de cobertura media.

Average sample coverage.									
IMGT/A	IMGT/B	IMGT/C	IMGT/DPA1	IMGT/DPB1	IMGT/DQA1	IMGT/DQB1	IMGT/DRB1	IMGT/DRB3	IMGT/DRB4
224	231	221	201	171	214	202	196	201	

95	111	100	80	59	72	73	29	32	
----	-----	-----	----	----	----	----	----	----	--

Muestra con avisos de cobertura mostrados en rojo.

Resumen de genes

Pase el cursor del ratón por encima del tipaje de un alelo para ver la siguiente información resumida.

04:01:01
07:01:01
Min Depth : 24
Mean Depth : 100
Percent Q30: 94

Min Depth: cobertura mínima de la secuencia en las regiones cubiertas por el panel de sondas. Las advertencias mostradas como barras rojas junto a la métrica aparecen cuando la profundidad mínima está por debajo del umbral establecido en las referencias.

01:01:01
02:01:01
Min Depth : 4
Mean Depth : 72
Percent Q30: 96

Mean Depth: cobertura media de la secuencia en las regiones cubiertas por el panel de sondas. Las advertencias mostradas como barras rojas junto a la métrica aparecen cuando la profundidad media es inferior a 100x de cobertura, o 50x para los alelos de los loci divididos.

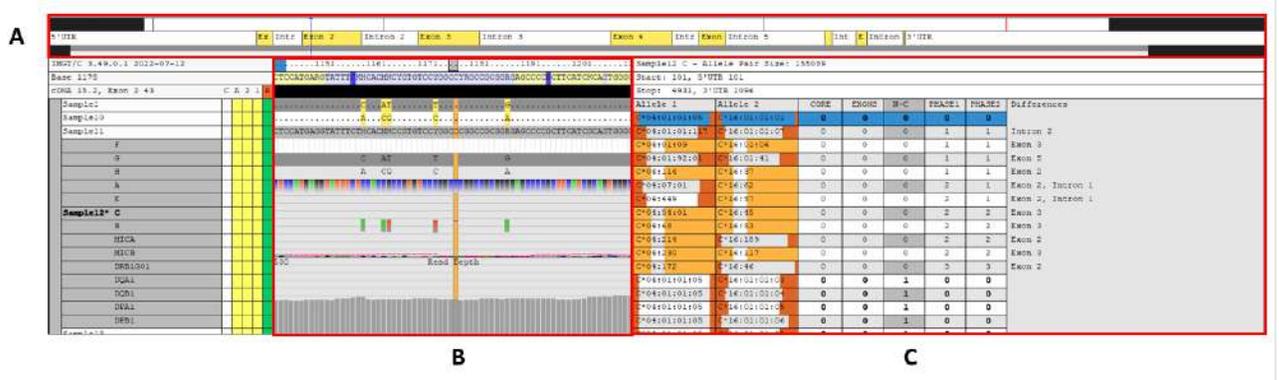
04:03:01
09:01:02
Min Depth : 40
Mean Depth : 178
Percent Q30: 93

Porcentaje Q30: porcentaje de bases > Q30.

NOTA: Cuando hay alelos de más de un grupo, el resumen muestra los resultados del primer alelo de la lista.

Vista Cobertura

La vista Cobertura (Coverage) comprende el Gráfico de confianza, la Estructura de locus y la Visualización del bloque de fase, el panel Secuencias y el panel Resultados. Para acceder a la vista Cobertura, en el grupo Vistas (Views), haga clic en **Show** y, a continuación, en **Coverage**.

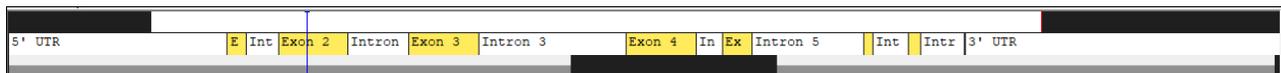


- A. **Gráfico de confianza, Estructura de locus y Visualización del bloque de fase** muestra una vista de la estructura de locus de alto nivel, como las UTR, los intrones y los exones, indica la confianza y la posición de la llamada de la base e indica los bloques de secuencia en fase.
- B. **Panel Secuencias:** muestra la secuencia de referencia consensuada, la secuencia de la muestra, las llamadas de las bases, la profundidad de la cobertura de la secuenciación, la calidad de las llamadas de las bases y las lecturas de secuencias alternativas.
- C. **Panel Resultados:** muestra las combinaciones de alelos que más se ajustan a la secuencia de la muestra, así como los mismatches entre la secuencia de la muestra y la secuencia de referencia cuando están presentes.

Mueva el cuadro de desplazamiento Coordenadas en el panel Secuencias (Sequences) para encontrar las posiciones en las que la confianza de la llamada de las bases es baja. Utilice el panel Resultados (Results) para encontrar mismatches con los pares de alelos.

Gráfico de confianza, Estructura de locus y Visualización del bloque de fase

Tres filas abarcan el ancho de la pantalla en la parte superior de la vista Cobertura (Coverage).



Arriba: **Gráfico de confianza**

En el medio: **Estructura de locus**

Abajo: **Visualización del bloque de fase**

Haga clic en una fila para mover la línea azul, que indica la región a la vista en el panel Secuencias (Sequences).

Gráfico de confianza

El Gráfico de confianza utiliza colores para mostrar las posiciones en las que la confianza de la llamada de las bases podría necesitar una investigación adicional.



El color negro indica que no hay cobertura. Las razones más comunes para no tener cobertura son las siguientes:

- La región está fuera del área de cobertura de la sonda para el locus analizado
- La secuencia de referencia contiene una inserción o una supresión que está ausente en la muestra

Los tonos rojos crecientes indican cualquiera de las siguientes condiciones:

- La cobertura de la secuencia \geq Q30 está por debajo del umbral mínimo de profundidad para el locus.
- La puntuación media de la calidad de las llamadas de las bases en esta posición es baja
- No se llama en consenso a una base por encima del umbral de ruido
- Se llama en consenso a una base por debajo del umbral de ruido

El color blanco indica una cobertura completa.

Estructura de locus

La Estructura de locus utiliza el amarillo para indicar un exón/secuencia codificante y el blanco para indicar un intrón/secuencia no codificante.



Amarillo: exones que se encuentran en la columna Mismatch activa del panel Resultados (Results).

Blanco: regiones no codificantes que se encuentran en la columna Mismatch activa del panel Resultados.

Gris: regiones que no están en la columna Mismatch activa del panel Resultados; por ejemplo, esto ocurre para los exones no cubiertos por el análisis de la capa del core cuando solamente la capa del core está activa.

Visualización del bloque de fase

En Visualización del bloque de fase, las regiones son de color gris claro o negro.



Gris claro: regiones en las que las bases se encuentran en fase de ejecución

Negro: secciones en las que no se puede establecer la relación de fase entre las posiciones polimórficas.

En este ejemplo, hay 3x bloques de secuencia en fase. La fase puede no ser posible si los fragmentos están secuenciados o son más pequeños que la distancia entre las posiciones polimórficas.

Panel Secuencias

El panel Secuencias (Sequences) de la vista Cobertura (Coverage) está compuesto por la sección Secuencias (Sequences) y la sección Llamadas de bases (Base Calling).

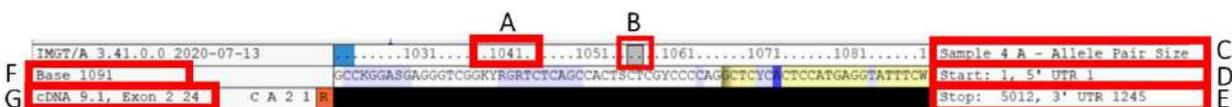
Sección Secuencias

La sección Secuencias (Sequences) del panel Secuencias (Sequences) incluye información de las comparaciones de las secuencias de referencia con las secuencias de la muestra. Estas filas se actualizan cuando se seleccionan diferentes pares de alelos en el panel Resultados (Results).

IMGT/B 3.49.0.1 2022-07-12	1221.....1231.....1241.....1251.....1261.....1271.....1281.....1291.....
Base 1273	TTATTGGGACSGGAAACACRGANSWNSAAGV3C M3RRCAGACTKACCGAGWGRCCCTGCGSAHCSYGCKC S TACTA
cDNA 77.2, Exon 2 229 C A 2 1 R	
AA.C.....T.....A.....CA.....AG.....A.....G.G.....
Sample17* BG.G.....G.....G.....GG.....GA.....C.....T.C.....
C	TTATTGGGACCGGASACACAGATCTKCAAGRCCAASRCACAGACTGACCGAGAGRRCCCTGCGGAMCCTGCKCSGCTACTAC
DFP1	
DFB1	A C T A CA AG A G G
DQA1	G G G G GG GA C T C

- 1 Coordenadas
- 2 Secuencia de consenso del locus
- 3 Indicador de edición de secuencias
- 4 Secuencia de referencia de alelo 1
- 5 Secuencia de referencia de alelo 2
- 6 Secuencia de consenso del locus
- 7 Indicador de confianza
- 8 Seguimiento de fases

1. Coordenadas



A Coordenadas de genes

B Cuadro de desplazamiento de coordenadas: arrastre el cuadro gris para explorar a lo largo de las coordenadas

C Nombre de la muestra y locus

D Posición y ubicación de inicio

E Posición y ubicación de la parada

F Coordenada de base resaltada en el exón, intrón o UTR (del panel Secuencias)

G Coordenada del codón asociado a la base resaltada en el gen (del panel Secuencias)

2. Secuencia de consenso de locus

La Secuencia de consenso de locus representa una colección de variantes y motivos comunes. No se incluyen las variantes raras.

- El amarillo indica la secuencia exónica/codificante.
- El blanco indica la secuencia intrónica/no codificante.
- El azul claro indica las eliminaciones presentes en algunos alelos. El número de bases resaltadas indica el tamaño de la eliminación.
- El azul oscuro indica las inserciones presentes en algunos alelos. Las bases insertadas caen directamente antes de las bases resaltadas.

Para el HLA-DRB1, la secuencia de consenso de la muestra se compara con secuencias de alelos que se han dividido en grupos con una estructura de secuencia intrónica similar. Por lo tanto, la secuencia de consenso representa el consenso del grupo de alelos mejor emparejados. Los alelos HLA-DRB1 se dividen en 4 grupos: DRB1G01, DRB1G03, DRB1G04 y DRB1G07.

3. Indicador de edición de secuencias

La fila Indicador de edición de secuencias muestra un código de colores del estado de edición y del estado de aceptación de cada base de la secuencia. El estado de edición de la base cambia cuando se edita la secuencia originalmente llamada utilizando el navegador.

Código de colores	Estado de edición	Estado de aceptación
	No editado	No aceptado
	No editado	Aceptado
	Editado	No aceptado
	Editado	Aceptado

4. Secuencia de referencia de alelo 1

La Secuencia de referencia del alelo 1 muestra la referencia IMGT/HLA para un alelo en el par de alelos resaltado y seleccionado en el panel Resultados. Secuencia de referencia del alelo 1 está sombreado en gris oscuro.

- Se muestra una base en esta fila cuando la secuencia del alelo difiere de la secuencia de consenso de la muestra, o la posición es heterocigota.
- Las posiciones en blanco indican que falta la secuencia de referencia para el alelo seleccionado.
- Un punto (.) indica que la secuencia del alelo es idéntica a la secuencia observada en la posición seleccionada.
- Una estrella (*) indica una secuencia sin información de intrones en la librería de referencia.

5. Secuencia de referencia de alelo 2

La Secuencia de referencia del alelo 2 muestra la referencia IMGT/HLA para un alelo en el par de alelos resaltado y seleccionado en el panel Resultados. Secuencia de referencia del alelo 2 está sombreado en gris claro.

CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Arnaboldi
M.P. 15533 - M.N. 13795
Dirección Técnica

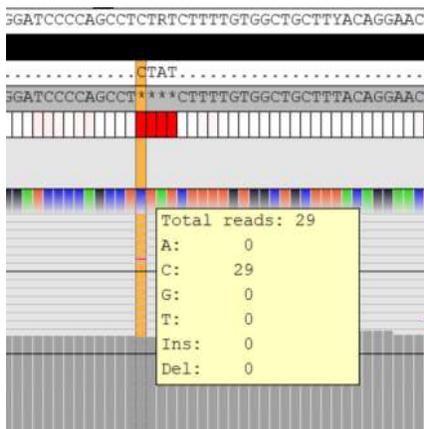
Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

- Se muestra una base en esta fila cuando la secuencia del alelo difiere de la secuencia de consenso de la muestra, o la posición es heterocigota.
- Las posiciones en blanco indican que falta la secuencia de referencia para el alelo seleccionado.
- Un punto (.) indica que la secuencia del alelo es idéntica a la secuencia observada en la posición seleccionada.
- Una estrella (*) indica una secuencia sin información de intrones en la librería de referencia.

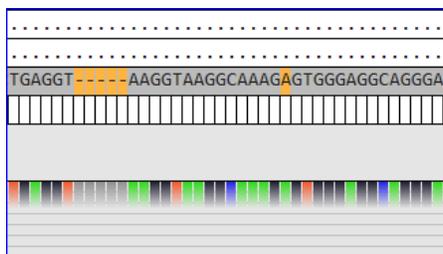
6. Secuencia de consenso de la muestra

La secuencia de consenso de la muestra permite visualizar la secuencia de consenso de la muestra secuenciada con el Panel de secuenciación AlloSeq Tx.

Las posiciones que estén por debajo del umbral mínimo de profundidad se excluirán de la secuencia de consenso de la muestra. Esto se indica con una estrella (*), como se muestra en la imagen a continuación. Para la mayoría de los loci, el umbral mínimo de profundidad se establece en 30 lecturas. Consulte las notas de cada versión de referencia para conocer los umbrales.



El sombreado naranja en el consenso de la muestra indica un polimorfismo que no está incluido en la secuencia combinada para el gen.



7. Indicador de confianza

El Indicador de confianza es una representación por base del gráfico de confianza. La confianza de una llamada de la base en una posición determinada puede variar en función de varios factores, como el equilibrio de los alelos, el umbral de ruido, la profundidad de la cobertura y la calidad de la secuencia. El color blanco en el Indicador de confianza denota una llamada de base de alta confianza. Un Indicador de confianza rojo denota llamadas de bases en las que se ha producido alguna de las siguientes condiciones:

- 1 <75% de las lecturas tienen una puntuación de calidad de Q30 o superior
- 2 No se llama en consenso a una base por encima del umbral de ruido
- 3 Se llama en consenso a una base por debajo del umbral de ruido
- 4 Posiciones editadas

8. Seguimiento de fases

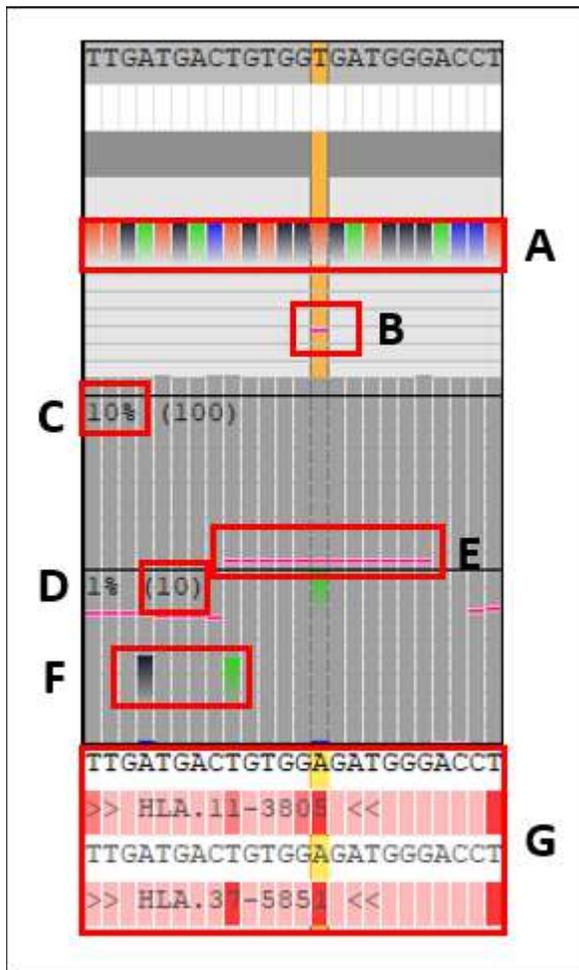
Para las combinaciones de alelos heterocigotos, las filas Seguimiento de fases muestran la relación de fase entre las bases conectadas por lecturas individuales o por lecturas emparejadas. Se realiza una asignación de fase solamente cuando la mayoría de las secuencias de fase son concordantes. El sombreado gris oscuro indica la fase relativa a Alelo 1 y el gris claro indica la fase relativa a la fase 2.

Resumen de la profundidad de la cobertura de la secuencia y llamada de bases

La ventana central muestra la información de la profundidad de cobertura de la secuencia (DoC) en forma de histogramas. Esta ventana resume las secuencias que contribuyen al consenso. Las barras grises indican el DoC en cada posición y el contenido de la secuencia se indica con los bloques de color. Los datos pueden mostrarse en forma lineal o logarítmica. La ubicación de los bloques coloreados indica el porcentaje de contribución de una base específica a la DoC.

CTRL + L permite cambiar entre la vista **logarítmica** y la **lineal**.

Vista logarítmica



A Base primaria llamada. Los siguientes colores indican la llamada de la base más frecuente para una posición determinada.

A C G T

A: verde
C: azul
G: negro
T: rojo

B Proporción aproximada de alelos. Cuando se resalta una localización de la base, la línea rosa superior indica la proporción media aproximada de profundidad de lectura del segundo alelo presente en la muestra para los loci heterocigotos.

C Proporción de llamada de bases. Se muestra utilizando una escala logarítmica, de la siguiente manera:

- La sección más baja tiene una proporción entre el 0% y el 1%
- La sección intermedia tiene una proporción entre el 1% y el 10%
- La sección más alta tiene una proporción entre el 10% y el 100%

D Profundidad de la cobertura de secuenciación. Se muestra con barras grises para cada base utilizando la escala logarítmica entre paréntesis:

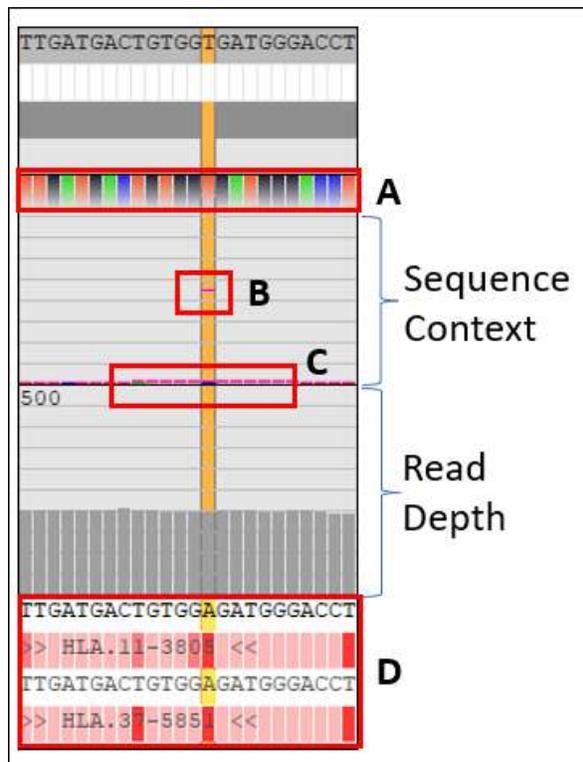
- La sección más baja muestra la profundidad de la cobertura entre 0x y 10x
- La sección intermedia muestra la profundidad de la cobertura entre 10x y 100x
- La sección más alta muestra la profundidad de la cobertura entre 100x y 1000x

NOTA: Si la cobertura es inferior a 30, no se muestra ninguna llamada.

- E Umbral de ruido aproximado. El ruido es un subproducto común de la especificidad, los errores de secuenciación y la alineación de secuencias. Assign establece dinámicamente un umbral de ruido en cualquier posición de la base. Una línea discontinua rosa indica el Umbral de ruido aproximado en todas las ubicaciones de la base. Normalmente, las llamadas de bases por debajo del umbral de ruido no se llaman.
- F Otras llamadas de bases. Muestra las llamadas de la base que difieren de la llamada de las bases más frecuentes para una posición determinada y utiliza los mismos indicadores de color utilizados en la sección Base primaria llamada.
- G Lecturas de secuencias que cubren esa posición de la base y que no se han incluido en la secuencia de consenso para la muestra

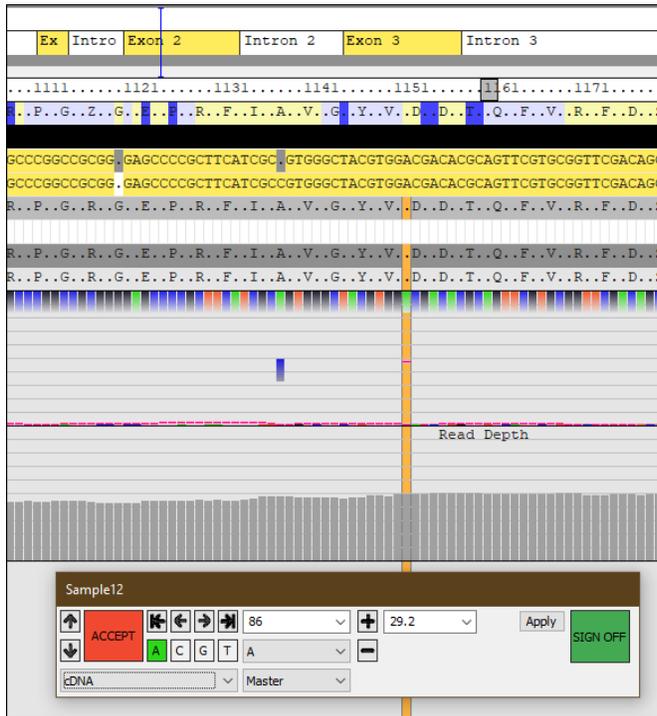
Vista lineal

- A Base llamada con más frecuencia
- B Proporción aproximada de alelos
- C Umbral de ruido aproximado
- D Lecturas de secuencias que cubren esa posición de la base y que no se han incluido en la secuencia de consenso para la muestra. Cada línea en el Contexto de secuencia es el 10%, cada línea en la Profundidad de lectura es 25 lecturas.



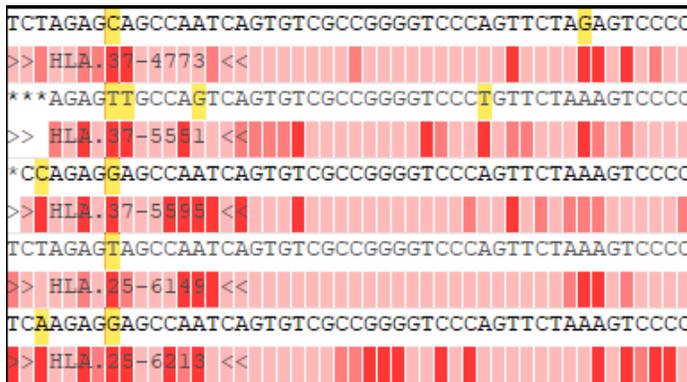
Vista de aminoácidos

Para activar la vista Aminoácidos, seleccione cDNA en el desplegable del navegador, haga clic en cualquier exón y pulse **Ctrl + A**.



Lecturas de secuencias

La sección Lecturas de secuencias (Sequence Reads) contiene las llamadas que no están incluidas en la Secuencia de consenso de la muestra en la posición de la base resaltada.



La calidad de la llamada de las bases para las lecturas alternativas, tal como se informa en el archivo FASTQ, se muestra debajo de la secuencia en un gradiente de color rojo.

- **Rojo oscuro:** llamada de bases de menor calidad.
- **Rosa claro:** llamada de bases de mayor calidad.

Haga clic con el botón derecho en una lectura para abrir un menú.

- **Copy Sequence:** coloca todas las bases de la lectura en el portapapeles
- **Copy Aligned:** coloca las bases utilizadas durante la alineación en el portapapeles
- **BLAST Sequence:** envía la secuencia completa a NCBI BLAST
- **Copy Pair:** coloca la secuencia de un par de lectura en el portapapeles

Panel Resultados

El panel Resultados (Results) enumera todos los pares de alelos IMGT/HLA que mejor coinciden con la secuencia de consenso de la muestra. El panel Resultados también proporciona información para cada uno de los pares de alelos enumerados.

A		B					C	Differences
Allele 1	Allele 2	CORE	EXONS	N-C	PHASE1	PHASE2		
A*02:01:01:01	A*30:01:01:01	0	0	0	0	0		
A*02:24:01	A*30:74	0	0	0	1	1	Exon 3	
A*02:34	A*30:157	0	0	0	1	1	Exon 2	
A*02:90	A*30:16	0	0	0	1	1	Exon 2	
A*02:174	A*30:54	0	0	0	1	1	Exon 3	
A*02:327	A*30:136	0	0	0	1	1	Exon 4	
A*02:35:01	A*30:44	0	0	0	2	2	Exon 2	
A*02:01:01:01	A*30:01:01:02	0	0	1	0	0		

- A Columnas de alelos
- B Columnas de mismatch de secuencias
- C Columna de diferencias
- D Los alelos CIWD se destacan en negrita

Columnas Alelos



Por defecto, todos los pares de alelos aparecen en orden según el número de mismatches que contienen al compararlos con la Secuencia de consenso de la muestra. Los pares de alelos sin mismatches aparecen en la parte superior de las columnas, seguidos de los pares con un número creciente de mismatches. Cuando la casilla Llamadas homocigotas duplicadas está desmarcada en la pestaña Informes, si no se detectan posiciones heterocigotas en la secuencia utilizada para el tipaje (por defecto son todos exones), la columna Alelo 2 contiene una X. La presencia de una X no constituye una confirmación de homocigosidad. Cuando se encuentra una posición heterocigota en la secuencia activa, se informa de un segundo alelo. Cuando la tabla de resultados o el informe se truncan a 2 o 3 campos, el segundo alelo puede aparecer idéntico. Al seleccionar Referenciados (Referenced) en el menú Orden de alelos (Allele Sorting), se ordenan los pares de alelos por los alelos más referenciados.

Alelos comunes, intermedios y bien documentados (CIWD/CWD)

En el panel Resultados (Results) y en el panel de Resumen (Summary), los alelos CIWD/CWD se muestran en negrita, como se ha descrito anteriormente.

Cobertura de referencia IMGT/HLA

Los pares de alelos están anillados en blanco y gris alternando filas para facilitar su visualización. A veces, el alelo incluye el color naranja, que indica que falta una parte de la secuencia de referencia en la referencia IMGT/HLA para ese alelo. El naranja oscuro indica que el alelo tiene cobertura genómica en la base de datos IMGT y que la secuencia que falta se encuentra en la región no codificante, mientras que el naranja claro indica que el alelo solamente tiene cobertura de cDNA en la base de datos IMGT y que la secuencia que falta se encuentra en la región codificante. La anchura del contenedor de alelos es directamente proporcional a la longitud de la secuencia.

Columnas de mismatch

El número de mismatches en las regiones seleccionadas aparece en las columnas a la derecha de los pares de alelos.

Allele 1	Allele 2	A	B	C	D	E
		CORE	EXONS	N-C	PHASE1	PHASE2
B*35:12:01:01	B*35:43:01	0	0	0	0	0
B*35:12:01:02	B*35:43:01	0	0	1	0	0
B*35:12:01:01	B*05:43:03	1	0	0	---	---
B*35:12:01:01	B*35:43:04	1	0	0	---	---
B*35:12:01:01	B*35:79	1	0	0	---	---

- A Mismatches en los exones centrales; incluidas posiciones adicionales para las mutaciones de expresión no codificante que se conocen. Para los alelos de la clase I el "núcleo" son los exones 2-4 y los exones 2-3 para la clase II
 - B Mismatches en los exones restantes
 - C Mismatches en la secuencia no codificante (intrones y UTR)
 - D Mismatches en la fase del alelo 1
 - E Mismatches en la fase del alelo 2
- Los guiones en las capas de fase indican un mismatch con la secuencia de referencia.

Cromoion

CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Arnaboldi
M.P. 15533 - M.N. 13795
Dirección Técnica

Oscar A. García

Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

Navegar por las columnas de mismatch

De las 5 posibles columnas de mismatch, las columnas de **Core and Exons** se activan al realizar la importación. Cuando la visualización por defecto se establece como Máxima (Maximum), la columna de no codificación estará presente para la Clase I pero no para la Clase II. Haga clic en el encabezado de la columna **Core** para expandir o contraer la columna **Exons**. Haga clic en el encabezado de la columna **Exons** para expandir o contraer la columna **N-C**. Las columnas de mismatch de fase están presentes solamente si es necesario, para resolver una ambigüedad de secuencia.

Columna de diferencias

La columna de diferencias indica la ubicación de las diferencias entre los pares de alelos en relación con el primer par de alelos de la lista. Cuando existen ambigüedades, se indican en esta columna las regiones en las que podrían resolverse.

Vista Lecturas

La vista Lecturas (Reads) muestra las lecturas de la secuencia utilizadas en la llamada de las bases para la posición seleccionada.

Para acceder a la vista Lecturas, en el grupo Vistas (Views), haga clic en **Show** y, a continuación, en **Reads**.

Sample18 A - Allele Pair Size: 1		Start: 1, 5' UTR 1	Stop: 4635, 3' UTR 868
		Allele 1	Allele 2
GGAGAGGCCAGGCGCCTTWA		A	G
GGAGAGGCCAGGCGCCTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTTAGGCCAAAAATCCCCCGGGTGGTCGGG		A*02:06:01:01	A*11:01:01:01
GGAGAGGCCAGGCGCCTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTTAGGCCAAAAATCCCCCGGGTGGTCGGG		A*02:06:09	A*11:01:34
GGAGAGGCCAGGCGCCTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTTAGGCCAAAAATCCCCCGGGTGGTCGGG		A*02:06:12	A*11:01:106
GGAGAGGCCAGGCGCCTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTTAGGCCAAAAATCCCCCGGGTGGTCGGG		A*02:06:25	A*11:01:90
>> HLA.11-13 <<		A*02:79:01	A*11:73
A	GGAGAGGCCAGGCGCCTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTTAGGCCAAAAATCCCCCGGGTGGTCGGG	A*02:137	A*11:119:01
B	>> HLA.37-25 <<	A*02:331	A*11:06
*****CCAGGCGCCTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTTAGGCCAAAAATCCCCCGGGTGGTCGGG		A*02:358	A*11:103
>> HLA.37-67 <<		A*02:415	A*11:224
GGAGAGGCCAGGCGCCTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTTAGGCCAAAAATCCCCCGGGTGGTCGGG		A*02:142	A*11:24:02
>> HLA.37-187 <<		A*02:06:01:01	A*11:01:01:03
C	GGCCAGGCGCCTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTTAGGCCAAAAATCCCCCGGGTGGTCGGG	A*02:06:01:01	A*11:01:01:05
>> HLA.37-201 <<		A*02:06:01:01	A*11:01:01:06

A Secuencias de nucleótidos

B Calidad de las llamadas de las bases del archivo FASTQ: la calidad se muestra en rosa claro (máxima calidad) a rojo oscuro (mínima calidad).

C Flechas de desplazamiento de lectura: utilice las flechas de desplazamiento para ver el siguiente lote de lecturas. También puede navegar pulsando Página arriba y Página abajo en su teclado para ocultar las lecturas de un nucleótido específico en la base seleccionada, pulse la tecla Mayúsculas y la letra del nucleótido al mismo tiempo. Las lecturas vuelven a aparecer utilizando las mismas teclas. Por ejemplo, pulse Mayúsculas + A para ocultar las lecturas que llaman a A en la posición seleccionada. Al hacer clic con el botón derecho del ratón en una secuencia, se abre un menú que incluye las opciones para copiar la secuencia en el portapapeles, enviar la secuencia a BLAST para su alineación o mostrar las advertencias de una muestra.

Las lecturas que contienen secuencia insertada cuando se comparan con la secuencia de referencia se indican con '+'. La secuencia insertada se muestra encima del + en la vista Lecturas. La secuencia insertada puede copiarse pulsando con el botón derecho del ratón sobre el + y seleccionando copiar inserción.

```

          CACA
CCCTCGAATACTGATGAGTGGTTCCCTTTGACACA+GCAGCAGCCTTGGGCCCGTGACTTTTCCTCTCAG
>> HLA.37-45 <<

          CACA
CCCTCGAATACTGATGAGTGGTTCCCTTTGACACA+GCAGCAGCCTTGGGCCCGTGACTT*****
>> HLA.37-59 <<

          CACA
CCCTCGAATACTGATGAGTGGTTCCCTTTGACACA+GCAGCAGCCTTGGGCCCGTGACTTTTCCTCTCAG
>> HLA.37-129 <<

          CACC
CCCTCGAATACTGATGAGTGGTTCCCTTTGACACA+GCAGCAGCCTTGGGCCCGTGACTT*****
>> HLA.11-173 <<

          CACC
*****ATGAGTGGTTCCCTTTGACACA+GCAGCAGCCTTGGGCCCGTGACTTTTCCTCTCAG
>> HLA.25-203 <<

```

Los asteriscos (*) en la vista Lecturas indican los enlaces entre pares de lectura.

```

CGCTTCCTCCGCGGGTACCGGCAGSAGCGCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAGGAGGACCTGCGCTCTTGGACCGCGCGGACATGGCAGCTCAG*****
>> HLA.37-111 <<
CGCTTCCTCCGCGGGTACCGGCAGSAGCGCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAGGAGGACCTGCGCTCTTGGACCGCGCGGACATGGCAGCTCAGACACCAAGCAC
>> HLA.37-25 <<
CGCTTCCTCCGCGGGTACCGGCAGSAGCGCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAGGAGGACCTGCGCTCTT*****
>> HLA.25-41 <<
CGCTTCCTCCGCGGGTACCGGCAGSAGCGCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAGGAGGACCTGCGCTCTTGGAC
>> HLA.37-93 <<
CGCTTCCTCCGCGGGTACCGGCAGSAGCGCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAGGAGGACCTGCGCTCTTGGACCGCGCGGACATGGCAGCTCAGACACCAAGCACAAGTGGG*****
>> HLA.37-95 <<
CGCTTCCTCCGCGGGTACCGGCAGSAGCGCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAGGAGGACCTGCGCTCTTGGACCGCGCGGACATGGCAGCTCAG*****
>> HLA.37-109 <<
CGCTTCCTCCGCGGGTACCGGCAGSAGCGCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAGGAGGACCTGCGCTCTTGGACCGCGCGGACATGGCAGCTCAGACACCAAGCACAAGTGGGAGGCGCCCATGCGCGGAGCAGTTGA
>> HLA.37-111 <<
CGCTTCCTCCGCGGGTACCGGCAGSAGCGCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAGGAGGACCTGCGCTCTTGGACCGCGCGGACATGGCAGCTCAGACACCAAGCACAAGTGGGAG*****
>> HLA.37-119 <<
CGCTTCCTCCGCGGGTACCGGCAGSAGCGCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAGGAGGACCTGCGCTCTTGGACCGCGCGGACATGGCAGCTC*****
>> HLA.37-191 <<
CGCTTCCTCCGCGGGTACCGGCAGSAGCGCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAGGAGGACCTGCGCTCTTGGACCGCGCGGACATGGCAGCTCAGACACCAAGCACAAGTGGGAGGCGCCCATGCGCGGAGCAGCAG
>> HLA.25-249 <<
*****SCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAGGAGGACCTGCGCTCTTGGACCGCGCGGACATGGCAGCTCAGACACCAAGCACAAGTGGGAGGCGCCCATGCGCGGAGCAGCAGA
>> HLA.11-277 <<
CGCTTCCTCCGCGGGTACCGGCAGSAGCGCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAGGAGGACCTGCGCTCTTGGACCGCGCGGACATGGCAGCTC*****

```

Vista Alineación y vista Referencia

La vista Alineación (Alignment) y la vista Referencia (Reference) ofrecen comparaciones de la secuencia de consenso de la muestra y de sus datos con las secuencias de la IMGT.

Vista Alineación

La vista Alineación muestra una comparación de las listas de secuencia de consenso de muestra y pares de alelos del panel Resultados (Results). Haga clic en los encabezados **Alelo 1** o **Alelo 2** para añadir o eliminar la contribución de los alelos en esa columna. Para acceder a la vista Alineación, en el grupo Vistas (Views), haga clic en **Show** y, a continuación, en **Alignment**.

Vista Referencia

La vista Referencia muestra una comparación de la secuencia de consenso de la muestra y las secuencias de referencia de un locus. Para acceder a la vista Referencia, en el grupo Vistas (Views), haga clic en **Show** y, a continuación, en **Reference**. Puede limitar los alelos de referencia que aparecen en la vista Referencia. Introduzca los alelos de referencia de interés en el campo inferior del navegador y, a continuación, haga clic en **Filtrar** a la derecha del campo de texto. Se muestran los alelos que contienen el texto introducido en la casilla. Puede introducir múltiples entradas, separadas por comas, en el campo Filtrar (Filter).

IMG1/A 3.35.0.1 2019-01-23 ... 2301 ... 2311 ... 2321 ... 2331 ... 2341 ... 2351 ... 2361 ... 2371

Base 2359 GTGGGCATCATTGCTGGCCTRGTTCTCYTTGGAGCTRTGTCRCCTGGAGCTGGTTCGCTGCYGTGAKGTGGAGGAG

cDNA 305.2, E... C A 2 1 R GTGGGCATCATTGCTGGCCTGGTTCCTTGGAGCTGTGATCACTGGAGCTGGTTCGCTGCCTGATGTGGAGGAG

A01269* A

E

C

B

DRB3

DRB5

DRB1G01

DQA1

DQB1

DPA1

A01269

2359

ACCEPT

A C G T C

Full Gene

Master

MM

Var

01:01:83, 01:01:01:01

Filter

Capítulo 6: Generación de informes

Tipos de informes

Assign genera un informe de genotipado, un informe FASTA o un informe HML.

- Informe de genotipado: informa sobre una sola muestra o locus o sobre todas las muestras y loci del proyecto.
- Informe de datos de secuencia en formato FASTA: produce un archivo fasta de la Secuencia de consenso de la muestra utilizando las designaciones IUPAC.
- Análisis de fragmentos: informes sobre la distribución de los fragmentos de ADN agrupados y leídos por el secuenciador de Illumina e importados a Assign.
- Informe HML: informa sobre una sola muestra o locus o sobre todas las muestras y loci del proyecto en formato HML.

Los informes pueden personalizarse con un logotipo, números de página, fecha y hora, y otras referencias sobre el informe. Para más información, consulte *Cambiar el logotipo del informe completo*.

Informe de genotipado

Haga clic en **Generate** para iniciar la herramienta de informes.

Reports

Genotyping HML FASTA Fragment Analysis

Filters

Sample:

Locus: Other

Report Options

Full Report

Sample:

Auditing:

Layers:

Empty

Empty

Audit Options: Save Confirm

Grouping: P Groups G Groups

Other: Full allele list Differences

Summary Table Report

Single Page Report Per Sample

Comments

Comment 1

Comment 2

Comment 3

Sort By

Name

Locus

Report Display Options

P Only

G Only

Default

Additional Options

NMDP

Motifs

Duplicate Homozygote Calls

Output Format

Excel Page Breaks

Text

XML

PDF

Generate Report

Done Update

Generar un informe completo

Un informe de genotipado completo incluye un encabezado con su logotipo preferido, los números de página, la fecha y la hora de creación, el nombre de la muestra y las referencias utilizadas, y el conjunto de CWD utilizado.

- 1 En la pestaña Genotipado (Genotyping), en la sección Filtros (Filters), utilice la lista **Muestra** (Sample) para seleccionar las muestras que se incluirán en el informe. Seleccione **Todo** (All) para incluir todas las muestras en el proyecto.
- 2 En la lista **Locus**, con la configuración Tx17, seleccione All, 6 Loci, 11 Loci, 17 Lociu Other.
 - a. Seleccione **All** para incluir todos los loci del proyecto en el informe.
 - b. Seleccione 6 Loci para incluir HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1 en el informe del proyecto.
 - c. Seleccione 11 Loci para incluir HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQB1, -DQA1, -DPB1, -DPA1 en el informe del proyecto.
 - d. Seleccione 17 Loci para incluir los 11 loci mencionados anteriormente más HLA-E, -F, -G, -H y MICA/MICB en el informe del proyecto.
 - e. Seleccionar Other permitirá al usuario elegir los loci para los que desea generar informes de la lista que se abre al seleccionar el botón Other.
- 3 En la sección Orden, seleccione **Name** (nombre de la muestra) o **Locus** para ordenar el informe.
- 4 Seleccione el botón de opción **Informe completo (Full Report)**.
- 5 En la sección Informe completo, utilice las listas **Muestra** para seleccionar **Summary** o **Auditing** de la lista. Seleccione **Empty** si no se necesita una lista de selección.
 - **Summary:** incluye cualquier advertencia sobre el tipaje y los pares de alelos que son compatibles con la Secuencia de consenso de la muestra (según se ha editado) para cada locus seleccionado en la sección Filtros. Las modificaciones adicionales de esta sección del informe están disponibles en Opciones de resumen (Summary options).
 - **Auditing:** para cada locus seleccionado en la sección Filtros, el informe de auditoría incluye el estado del revisor como Aprobado (Pass) o No aprobado (Fail) y si todas las posiciones han sido confirmadas como Aprobadas o No aprobadas. El informe marca la fecha, la hora y el usuario de cada elemento aprobado. Las modificaciones adicionales de esta sección del informe están disponibles en Opciones de auditoría (Audit options).
- 6 En la sección Informe completo, utilice las listas **Capas (Layers)** para seleccionar el nivel de detalle de las capas que se incluirán en el informe. Seleccione **Empty** si no se necesita una lista de selección.
 - **Sequences:** para cada locus seleccionado en los filtros, el informe Sequences imprime la Secuencia de consenso de la muestra (según se ha editado).
 - **Edit List:** para cada locus seleccionado en los filtros, el informe Edit List muestra las posiciones editadas, la edición realizada y el usuario que la ha realizado.
 - **Mismatch List:** para cada locus seleccionado en los filtros, Mismatch List muestra las mejores mismatches con la muestra. Los límites de mismatch se aplican a toda la secuencia del gen. Esta característica es útil para los nuevos alelos.
- 7 En la sección Opciones de resumen, seleccione la casilla de verificación de cada opción que desee incluir en el informe.

Opción de resumen	Descripción
Lista completa de alelos (Full Allele List)	Incluye todos los alelos.
P Groups	Informa de alelos ambiguos para los grupos P, todos los restantes alelos para 2 campos. Para más información, consulte hla.alleles.org/alleles/p_groups.html .
G Groups	Informa de alelos ambiguos para los grupos G, todos los restantes alelos para 3 campos. Para más información, consulte hla.alleles.org/alleles/g_groups.html .
NMDP	Proporciona el código NMDP correspondiente al par de alelos coincidentes para un locus.
Diferencias (Differences)	Incluye la información de la columna de diferencias del panel Resultados.

Motivos (Motifs) Incluye las variantes de expresión Bw4/Bw6 y DPB1, así como otros motivos que figuran en las Notas de publicación de referencia (Reference Release Notes).

NOTA: Si el resultado de una muestra es ambiguo, el software aplicará automáticamente la resolución del grupo G o P al nivel más alto de tipaje posible. Si no es posible condensar la ambigüedad como un grupo G o P, la lista de combinaciones de alelos ambiguos se enumerará en el informe en orden numérico. Además, las cadenas de ambigüedad se informarán en una nueva pestaña "Ambigüedades" (Ambiguities) en el informe resumido.

Para mostrar todos los alelos como grupo P o grupo G, seleccione P only o G only en las opciones de visualización del informe. Tenga en cuenta que al seleccionar esta opción en la ventana de informes también se aplica la selección al panel Resumen. Utilice la combinación de teclas CTRL+G para alternar entre P only, G only y Default en el panel Resumen.

- 8 En la sección Opciones de auditoría, seleccione **Save** para generar un historial de eventos guardados y cargados. Seleccione **Confirm** para incluir un historial de confirmaciones de revisores.

Auditing	
First Review:	Fail
Final Review:	Pass
Confirmed All Positions:	Fail
Mar 01 2019 09:35	admin set the final review to pass
Mar 01 2019 09:36	admin saved the sample
Mar 01 2019 09:36	admin saved the sample

- 9 En la sección Formato de salida (Output format), seleccione uno de los siguientes formatos:
- **Text:** genera un informe de las opciones seleccionadas en formato de texto.
 - **Excel:** genera un informe de las opciones seleccionadas en una hoja de cálculo de Excel.
 - **XML:** genera un informe de las opciones seleccionadas en un archivo *.xml etiquetado que es el más adecuado para la importación a una base de datos externa.
 - **PDF:** genera un informe de las opciones seleccionadas en formato PDF.
 - **Page Breaks:** añade saltos de página a la hoja de cálculo de Excel.
- 10 [Opcional] Seleccione **Duplicar llamadas homocigotas (Duplicate Homozygote Calls)** para imprimir 2 alelos en lugar del alelo 1 y X para las muestras homocigotas putativas. Esta casilla también afectará a la forma en que se muestran las llamadas homocigotas en la vista Resumen y en los paneles de alelos. Para mantener esta preferencia, marque o desmarque la casilla según sea necesario, haga clic en Update en la pestaña Informes y luego en la sección Ajustes (Settings) de la cinta de Inicio (Home).
- 11 Haga clic en **Generar informe (Generate Report)**. Se generan los informes de Excel, que se abren automáticamente en Excel. Los informes de texto o XML se generan cuando se elige una ubicación donde guardarlos en el ordenador.

Informe de tabla de resumen

Un informe de tabla de resumen (Summary table report) incluye un encabezado con su logotipo preferido, los números de página, la fecha y la hora de creación, la versión del software, las referencias utilizadas, el conjunto de CWD utilizado y el operador que ha generado el informe. Los paneles Resumen (Summary) se muestran en pestañas separadas del cuaderno de trabajo Excel.

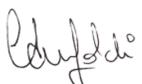
- 1 En la pestaña Genotipado (Genotyping), en la sección Filtros (Filters), utilice la lista **Muestra (Sample)** para seleccionar las muestras que se incluirán en el informe. Seleccione **Todo (All)** para incluir todas las muestras en el proyecto.
- 2 En la lista **Locus**, con la configuración Tx17, seleccione All, 6 Loci, 11 Loci, 17 Loci u Other.
 - a. Seleccione **All** para incluir todos los loci del proyecto en el informe.
 - b. Seleccione 6 Loci para incluir HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1 en el informe del proyecto.
 - c. Seleccione 11 Loci para incluir HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQB1, -DQA1, -DPB1, -DPA1 en el informe del proyecto.

- d. Seleccione 17 Loci para incluir los 11 loci mencionados anteriormente más HLA-E, -F, -G, -H, MICA y MICB en el informe del proyecto.
- e. Seleccionar Other permitirá al usuario elegir los loci para los que desea generar informes de la lista que se abre al seleccionar el botón Other.
- 3 Seleccione el botón de opción **Informe de tabla de resumen**.
- 4 En Additional Options, seleccione entre NMDP y Motifs si lo desea.
 - a. **IMPORTANTE:** Al seleccionar **Motifs/Additional Options**, se incluirá la información del motivo en la pestaña Resumen del informe de Excel. Esta línea adicional por muestra puede generar un formato de informe incompatible con algunos LIMS y utilidades de bases de datos. Si se produce esta incompatibilidad con su LIMS, se recomienda dejar la casilla Motifs sin seleccionar en las opciones de resumen (utilice la opción Update para conservar la configuración) y utilizar en su lugar la pestaña Motivos del informe de Excel.
- 5 Seleccione el formato de salida deseado: Text o Excel.
- 6 [Opcional] Seleccione **Duplicar llamadas homocigotas (Duplicate Homozygote Calls)** para imprimir 2 alelos en lugar del alelo 1 y X para las muestras homocigotas putativas. Esta casilla también afectará a la forma en que se muestran las llamadas homocigotas en la vista Resumen y en los paneles de alelos. Para mantener esta preferencia, marque o desmarque la casilla según sea necesario, haga clic en Update en la pestaña de informes y luego en la sección Ajustes (Settings) de la cinta de inicio.
- 7 **P only y G only:** Al seleccionar P only o G only en **Opciones de visualización del informe (Report Display Options)**, se informará de todos los alelos para grupos P o G. Al seleccionar Default, se informará de los alelos ambiguos para el grupo P o G, según proceda. Tenga en cuenta que, al seleccionar estas opciones, la selección también se aplica al panel Resumen. Utilice la combinación de teclas CTRL+G para alternar entre P only, G only y Default en el panel Resumen.
- 8 Haga clic en **Generar informe (Generate Report)**. Se generan los informes de Excel, que se abren automáticamente en Excel. Los informes de texto se generan cuando se elige una ubicación donde guardarlos en el ordenador.

Informe de una sola página por muestra

El informe de una sola página muestra los alelos de cada gen, así como los grupos G y los grupos P en una sola página para cada muestra. También se indica el contenido genético de cada gen. Tenga en cuenta que, para los genes en los que se han seleccionado 4 campos y el contenido del gen es inferior a 98,5, el alelo de 4 campos no aparecerá en la lista.

- 1 En la pestaña Genotipado, en la sección Filtros, utilice la lista **Muestra** para seleccionar las muestras que se incluirán en el informe. Seleccione **Todo** para incluir todas las muestras en el proyecto.
- 2 En la lista **Locus**, con la configuración Tx17, seleccione All, 11 Loci, 17 Lociu Other.
 - a. Seleccione **All** para incluir todos los loci del proyecto en el informe.
 - b. Seleccione 11 Loci para incluir HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQB1, -DQA1, -DPB1, -DPA1 en el informe del proyecto.
 - c. Seleccione 17 Loci para incluir los 11 loci mencionados anteriormente más HLA-E, -F, -G, -H, MICA y MICB en el informe del proyecto.
 - d. Seleccionar Other permitirá al usuario elegir los loci para los que desea generar informes de la lista que se abre al seleccionar el botón Other.
- 3 Seleccione el botón de opción **Informe de una sola página por muestra (Single Page Report Per Sample)**.
- 4 Seleccione el formato de salida deseado: Text, Excel, XML o PDF.
- 5 [Opcional] Seleccione **Duplicar llamadas homocigotas (Duplicate Homozygote Calls)** para imprimir 2 alelos en lugar del alelo 1 y X para las muestras homocigotas putativas. Esta casilla también afectará a la forma en que se muestran las llamadas homocigotas en la vista Resumen (Summary) y en los paneles de alelos. Para mantener esta preferencia, marque o desmarque la casilla según sea necesario, haga clic en Update en la pestaña Informes (Reports) y luego en la sección Ajustes (Settings) de la cinta de Inicio (Home).
- 6 Haga clic en Report. Se generan los informes de Excel, que se abren automáticamente en Excel. Los informes de texto, XML o PDF se generan cuando se elige una ubicación donde guardarlos en el ordenador.



CROMOION s.r.l.
Fam. Cecilia A. Amaboldi
M.P. 15533 • M.N. 13795
Dirección Técnica



Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

Cambiar el logotipo del informe completo

Puede modificar la imagen editando directamente la plantilla de Excel que se incluye con Assign. Para cambiar el logotipo, abra Excel y elija el archivo de plantilla Genotyping.xlt. En una instalación por defecto, la plantilla se encuentra en C:\ProgramData\CareDx\AlloSeq v1.0\data\templates. Para una carpeta de instalación personalizada, vaya a la carpeta apropiada y luego seleccione data\templates\Genotyping.xlt. Para sustituir la imagen del logotipo, en Imprimir (Print), vea Configuración de página (Page Setup) y edite el encabezado y el pie de página.

Cambiar el logotipo del informe PDF

Puede modificar la imagen sustituyendo la imagen .png que se incluye con Assign. Para cambiar el logotipo, guárdelo como "CareDx-logo.png" y sustituya la imagen ubicada en C:\ProgramData\CareDx\AlloSeq v1.0.3\data\templates. Se recomienda utilizar una imagen de aproximadamente 513 x 219 píxeles.

Informe FASTA

El formato de archivo FASTA es un formato sencillo basado en texto que se ha convertido en una herramienta bioinformática estándar para representar secuencias genéticas. El formato FASTA comienza con una línea de descripción que incluye un símbolo mayor que (>) seguido del identificador único que podría ser el nombre de la muestra/locus/entrada. La siguiente línea en el FASTA es la secuencia de consenso de la muestra utilizando las designaciones de la IUPAC.

- 1 Haga clic en **Generar (Generate)** para iniciar la herramienta de informes y seleccione la pestaña FASTA.
- 2 En la sección Filtros de salida y numeración (Output Filters and Numbering), utilice la lista **Muestra (Sample)** para seleccionar las muestras que se incluirán en el informe. Seleccione **Todo (All)** para incluir todas las muestras. El nombre de la muestra se incluye automáticamente en la línea de descripción FASTA que precede a la secuencia.
- 3 En la lista **Locus**, seleccione un locus individual para informar sobre las muestras seleccionadas. Seleccione **Todo** para incluir todos los loci de las muestras seleccionadas. Seleccione la casilla para insertar el nombre del locus en el archivo FASTA (por ejemplo, > Nombre de la muestra_IMGT/A).
- 4 En la lista **Capas (Layer)**, seleccione una sola capa para restringir la salida. Seleccione la casilla para insertar el nombre de la capa en el archivo FASTA.
- 5 En la lista **Grupo (Group)**, seleccione un grupo designado de regiones para restringir la salida.
- 6 En la lista **Región**, seleccione una región designada, como un exón. Seleccione la casilla para insertar el nombre de la región en el archivo FASTA.
- 7 En la sección Ordenar por (Sort by), seleccione **Name** (nombre de la muestra) o **Locus** para ordenar el informe.
- 8 En la sección Opciones (Options), seleccione la casilla **Pad Ends** para añadir N llamadas de bases a cada secuencia a fin de cubrir todo el amplicón.
- 9 Haga clic en **Generar informe (Generate Report)** y, a continuación, elija una ubicación para guardarlo en su ordenador.

Análisis de fragmentos

El análisis de fragmentos es un informe de Excel que proporciona detalles de la distribución de los tamaños de los fragmentos importados en Assign para cada muestra y locus.

- 1 Haga clic en **Informes (Reports)** para iniciar la herramienta de informes.
- 2 En la pestaña de Análisis de fragmentos (Fragment Analysis), realice una de las siguientes acciones:
 - a. Seleccione una sola muestra del proyecto y seleccione un solo locus o todos los locus en las listas desplegables
 - b. Seleccione todas las muestras y seleccione un solo locus o todos los locus en las listas desplegables
- 3 Haga clic en **Report** para generar el análisis de fragmentos.

El análisis de fragmentos se abre automáticamente en Excel.

Informes de locus personalizados

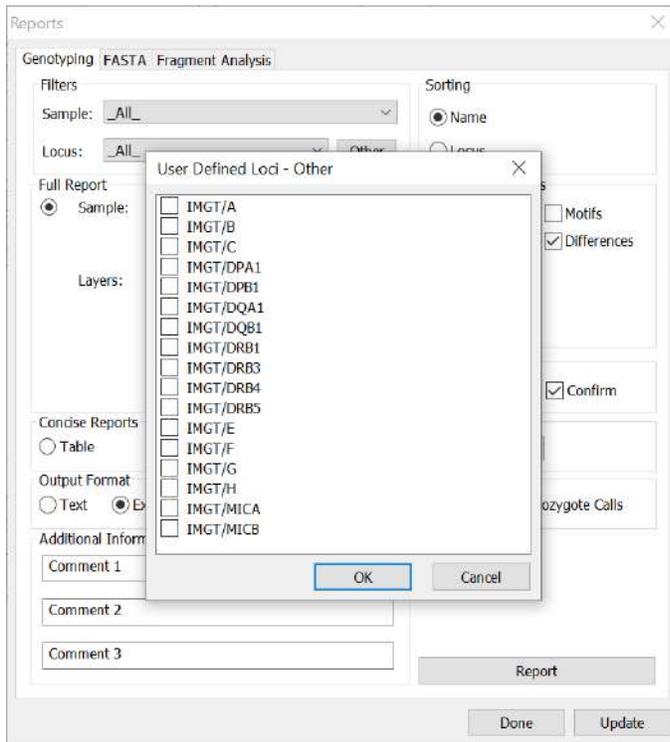
Hay dos conjuntos de locus predefinidos en la configuración de Tx17 (11 loci o 17 loci).

11 Loci: HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQB1, -DQA1, -DPB1, -DPA1

17 Loci: Los mencionados anteriormente más HLA-E, -F, -G, -H y MICA/MICB.

Si es necesario, se puede generar un informe para mostrar loci específicos:

- 1 Haga clic en **Informes (Reports)** para iniciar la herramienta de informes.
- 2 En el cuadro de locus, seleccione **Other**.
- 3 Haga clic en el botón **Other**.
- 4 Seleccione los loci que desea informar marcando las casillas correspondientes y luego haga clic en OK.
- 5 Haga clic en Update en la pestaña Informes y en la sección Ajustes (Settings) de la cinta de Inicio (Home) para guardar esta configuración para su uso futuro.
- 6 Haga clic en **Report** para generar el informe.



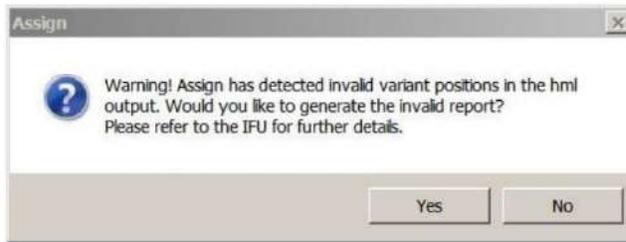
Informe HML

La funcionalidad de informes HML se ha incluido en AlloSeq Assign v1.0.3 para permitir el envío de datos al IHIWS. El informe HML generado a partir de AlloSeq Assign es específico del esquema 1.0.1 proporcionado por NMDP. Para más información acerca de HML y el esquema utilizado, consulte <https://bioinformatics.bethematchclinical.org/hla-resources/hml/> y <http://schemas.nmdp.org/>.

Para generar el informe HML:

- 1 Haga clic en **Generar (Generate)** para iniciar la herramienta de informes y seleccione la pestaña HML.
- 2 Utilice la lista **Muestra (Sample)** para seleccionar las muestras que se incluirán en el informe. Seleccione **Todo (All)** para incluir todas las muestras en el proyecto.
- 3 Haga clic en **Modify Additional Information** e introduzca los detalles. La información adicional se guardará después de cerrar la ventana de informes.
- 4 Por defecto, Assign generará un GLString por locus. Al seleccionar la opción **Summative GLString**, se realizará un informe GLString para cada muestra.

IMPORTANTE Al generar el informe HML, AlloSeq Assign realiza una comprobación de validez de las posiciones de las variantes de cada gen para asegurarse de que no se informa de nucleótidos degenerados. Si un gen no supera esta comprobación de validez, Assign mostrará el siguiente mensaje de error:



Si selecciona No al mensaje, se generará un informe HML que no incluirá el gen impactado.

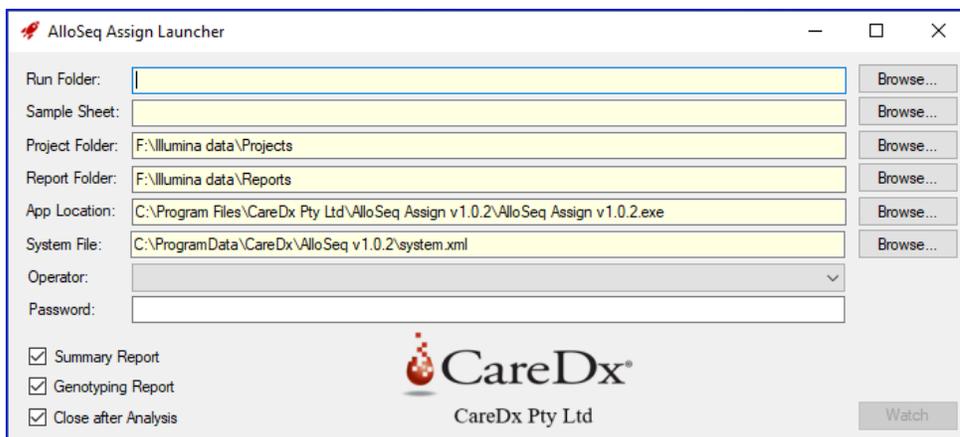
Para que los usuarios puedan editar y enviar el gen afectado, al seleccionar Yes se generarán 2 informes, uno sin el gen afectado y otro con las variantes no válidas. Tenga en cuenta que los archivos HML generados con variantes no válidas no pueden enviarse al IHIWS. Se han observado posiciones de variantes no válidas en 1/25.500 genes analizados, debido a la falta de fase en la que el software no puede atribuir la posición de la variante a ninguno de los alelos.

Capítulo 7: AlloSeq Assign Launcher

El software AlloSeq Assign versión 1.0.2 y superior es compatible con AlloSeq Assign Launcher.

AlloSeq Assign Launcher es una aplicación independiente diseñada para iniciar automáticamente AlloSeq Assign una vez que los archivos fastq han sido creados por el secuenciador.

Consulte IFU098_AlloSeq Assign Launcher para conocer los detalles sobre el uso de esta aplicación.



Capítulo 8: Glosario

CIWD/CWD: Los alelos comunes, intermedios y bien documentados (CIWD) identifican el subconjunto de alelos HLA cuyas frecuencias son bien conocidas (comunes), o los alelos identificados múltiples veces mediante el uso de métodos de tipaje basados en la secuencia (bien documentados). Para más información sobre los alelos CIWD, consulte <https://www.ihw18.org/component-immunogenetics/download-common-and-well-documented-alleles-3-0/> O bien, para acceder a la lista de CWD, consulte <http://igdawg.org/cwd.html>

Grupos G: Alelos HLA que tienen secuencias de nucleótidos idénticas en los exones que codifican los dominios de unión al antígeno (exón 2 y 3 para el HLA clase I y exón 2 solamente para los alelos HLA clase II). Para obtener más información, consulte http://hla.alleles.org/alleles/g_groups.html

Grupos P: Alelos HLA que tienen secuencias de proteínas idénticas en los exones que codifican los dominios de unión al antígeno (codificados por exón 2 y 3 para el HLA clase I y exón 2 solamente para los alelos HLA clase II). Para obtener más información, consulte http://hla.alleles.org/alleles/p_groups.html

Nomenclatura HLA: Assign convierte las secuencias en la nomenclatura HLA versión 3.0, establecida en 2010, de acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la OMS para los Factores del Sistema HLA (www.imgt.org).

La nomenclatura HLA utiliza el siguiente formato: **HLA-A*02:01:01:02L**

HLA	El prefijo HLA
-	El guión separa el nombre del gen del prefijo HLA.
A	El nombre del gen.
*	El asterisco separa el nombre del gen de la información de la secuencia e indica el tipaje genético.
02	Campo 1: el grupo de alelos.
:	Los dos puntos separan los campos.
01	Campo 2: diferenciar los alelos con una secuencia proteica única.
:	Los dos puntos separan los campos
01	Campo 3: sustituciones sinónimas de ADN dentro de las regiones codificantes del gen.
:	Los dos puntos separan los campos.
02	Campo 4: diferencias en las regiones no codificantes del gen.
L	Este modificador de expresión está presente independientemente del número de campos que se comuniquen. Hasta la fecha, son posibles los siguientes modificadores: <ul style="list-style-type: none">• N indica Null (nulo): un alelo que no se expresa.• L indica Low (bajo): un alelo que codifica una proteína con una expresión significativamente reducida o baja en la superficie celular.• S indica Secreted (secretado): un alelo que codifica una proteína que se expresa solamente como una molécula secretada.• Q indica Questionable (cuestionable): un alelo con una mutación que se ha demostrado previamente que tiene un efecto significativo en la expresión de la superficie celular, pero que no está confirmado. Por lo tanto, su expresión sigue siendo cuestionable.

Nomenclatura MICA/B:

La nomenclatura MICA/B utiliza el siguiente formato: **MICB*002:01:01**

MIC	El prefijo MIC
B	El nombre del gen.
*	El asterisco separa el nombre del gen de la información de la secuencia e indica el tipaje genético.
002	Campo 1: diferencia los alelos con una secuencia proteica única.
:	Los dos puntos separan los campos.
01	Campo 2: sustituciones sinónimas de ADN dentro de las regiones codificantes del gen.

CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Arnaboldi
M.P. 15533 - M.N. 13795
Dirección Técnica

Oscar A. García
Socios gerentes
Cromoion
Cromoion

: Los dos puntos separan los campos.

01 Campo 3: diferencias en las regiones no codificantes del gen.

Designaciones de bases degeneradas: Las filas de la secuencia de consenso en la sección de secuencias (filas 2 y 6) incluyen las designaciones de bases degeneradas de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC).

Código IUPAC	Bases	Descripción
W	A T	Débil
S	C G	Fuerte
M	A C	Amino
K	G T	Keto
R	A G	Purina
Y	C T	Pirimidina
B	G C T	no A
D	A G T	no C
H	A C T	no G
V	A C G	no T
N	A C G T	todas las bases
*		ninguna llamada de la base

Motivos de la secuencia BW4/Bw6: La funcionalidad del motivo de la secuencia en Assign informa de la presencia de motivos definidos basados en secuencias de nucleótidos o aminoácidos en la alineación de la secuencia. El reconocimiento de los motivos Bw4 y Bw6 que se ha comunicado desde Assign se basa en las secuencias de aminoácidos comunicadas por Gumperz et al.

Serological epitope	Class I locus	Class I position				
		77	80	81	82	83
Bw4	HLA-A,B	N	I	A	L	R
	HLA-B	N	T	A	L	R
	HLA-A	S	I	A	L	R
	HLA-B	S	T	L	L	R
	HLA-B	D	T	L	L	R
Bw6	HLA-B	S	N	L	R	G
	HLA-B	G	N	L	R	G

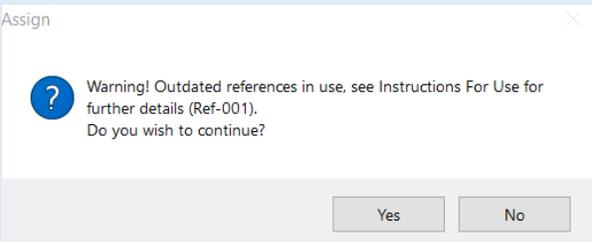
Figura 1: Motivos de secuencia HLA de clase I que determinan los epítomos serológicos Bw4 y Bw6.

¹Gumperz, J., Litwin, V., Phillips, J., Lanier, L. and Parham, P. (1995). The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *Journal of Experimental Medicine*, 181(3), pp.1133-114

Teclas de acceso directo:

Teclas	Descripción
Ctrl + L	Cambio de registro/lineal
Ctrl + M	Ocultar/mostrar el área del mapa
Ctrl + F	Encontrar la secuencia
Ctrl + A	Activar vista Aminoácidos
Mayúsculas + A/G/C/T	Filtrar por base
Ctrl + G	Cambia entre G only, P only e informe/visualización de resumen por defecto
Flecha derecha	Mueve una base a la derecha
Ctrl + Flecha derecha	Pasa a la siguiente posición marcada

Ctrl + Mayúsculas + Flecha derecha	Se desplaza al final de la secuencia de consenso
Flecha izquierda	Mueve una base a la izquierda
Ctrl + Flecha izquierda	Cambia a la anterior posición marcada
Ctrl + Mayúsculas + Flecha izquierda	Se desplaza al inicio de la secuencia de consenso
Flecha arriba	Se desplaza a la muestra anterior
Mayúsculas + Flecha arriba	Reduce el tamaño de la visualización de profundidad de la cobertura de la secuencia
Flecha abajo	Se desplaza a la siguiente muestra
Mayúsculas + Flecha abajo	Incrementa el tamaño de la visualización de profundidad de la cobertura de la secuencia
Tab	Confirma la llamada de la base en la posición actual
A/C/G/T/M/K/R/W/D/S/Y/B/V/H/N	Edita la base en la posición actual
Mayúsculas + I	Alterna la información de lectura

Mensajes de error	Descripción
<p>Ref-001</p> 	<p>La versión 1.0.3 de AlloSeq Assign incluye una serie de cambios que dependen del uso de las versiones de referencia 3.45.1.1 y posteriores.</p> <p>El uso de referencias anteriores a esta puede dar lugar a problemas de desfase y ambigüedades adicionales con DQB1*03.</p>

Capítulo 9: Asistencia y datos de contacto

Fabricante:

CareDx Pty Ltd,
20 Collie Street, Fremantle, WA, Australia, 6160.
Tel.: +61-8-9336-4212
Correo electrónico: orders-aus@caredx.com
Sitio web: <http://www.caredx.com>

Distribuido por:

Asia Pacífico (APAC)
CareDx Pty Ltd,
20 Collie Street, Fremantle, WA, Australia, 6160.
Tel.: +61-8-9336-4212
Correo electrónico: orders-aus@caredx.com
Sitio web: <http://www.caredx.com>

Europa, Oriente Medio y África (EMEA)
CareDx AB,
Franzégatan 5, SE-112 51 Estocolmo, Suecia.
Tel.: +46-8-508 939 00
Fax: +46-8-717 88 18
Correo electrónico: orders-se@caredx.com
Sitio web: <http://www.caredx.com/>

Continente americano
CareDx Lab Solutions Inc.,
901 S. Bolmar St., Suite R, West Chester, PA 19382
Tel.: 1-877-OLERUP1
Fax: 610-344-7989
Correo electrónico: orders-us@caredx.com
Sitio web: <http://www.caredx.com>

Asistencia técnica e información de incidentes graves:

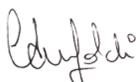
Correo electrónico: techsupport-labproducts@caredx.com

Cualquier incidente grave que se haya producido en relación con el producto se comunicará al fabricante y a la autoridad competente del estado miembro en el que esté establecido el usuario y/o el paciente

Para más información, consulte el sitio web de CareDx (<https://www.caredx.com/contact-us/>).

Productos relacionados:

AlloSeq Tx


CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Amaboldi
M.P. 15533 - M.N. 13795
Dirección Técnica


Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

Capítulo 10: Historial de revisiones

Versión	Fecha	Modificación
1.0	06 abr 20	Primera edición de AlloSeq Assign IFU CE IVD. Editada por E. Naughton el 29 abr 20
1.1	11 may 20	Se han añadido detalles a Detalles de Indel e Indicadores de Confianza. Se han añadido instrucciones para generar un informe conciso. Se ha añadido Limitación del software. Se ha actualizado la sección Informes para incluir el formato PDF. JE actualizó las referencias de los grupos DRB1 en la sección Limitaciones
1.2	19 jun 20	Se ha añadido la sección Referencias a Limitaciones Reeditado por E. Naughton el 19 jun 20
2.0	04 dic 20	Se ha actualizado Limitaciones Reeditado por E. Naughton el 04 dic 20
3.0	30 mar 21	Se ha actualizado y revisado IFU para reflejar los cambios en la v1.0.2.1270: - Se ha añadido una referencia a AlloSeq Assign Launcher: Capítulo 7: AlloSeq Assign Launcher - Se ha añadido la descripción del sombreado naranja en el consenso de la muestra: Capítulo 5: Sección Secuencias - Se ha añadido una descripción adicional de la columna de diferencias: Capítulo 5: Columna de diferencias - Se ha añadido una referencia a la configuración de Tx8: Capítulo 4: Agregar operadores Capítulo 6: Generación de informes - Se ha añadido ABO y CCR5: Capítulo 1: Bases de datos de referencia, Capítulo 5: Pestaña Inicio y referencias de Assign Capítulo 6: Informes de locus personalizados Capítulo 8: Glosario - Se han actualizado las características de rendimiento con los tiempos de importación para diferentes ordenadores: Capítulo 1: Características de rendimiento - Se ha añadido la vista Aminoácidos: Capítulo 5: Sección Secuencias - Se ha añadido la referencia a AlloSeq Tx 8: Capítulo 1: Introducción y características de rendimiento Reeditado L. Langley 31 mar 21
4.0	01 abr 21	Se ha añadido la exención de responsabilidad limitada para los archivos CIWD modificados por el usuario en el capítulo 5: Anotaciones. Reeditado L. Langley 01 abr 21
5.0	14Dec21	Se ha actualizado y revisado IFU para reflejar los cambios en la v1.0.3: - Se ha actualizado la sección de informes con una nueva captura de pantalla para la ventana de informes. - Se ha añadido un método para cambiar el logotipo del informe pdf. - Se han eliminado las referencias a informes concisos. - Se ha actualizado el proceso de informes completos en función de los cambios en la ventana de informes. - Se han actualizado los métodos Informe de tabla de resumen e Informe de una sola página por muestra. - Se ha añadido la sección de informes HML. - Se han añadido mensajes de error y atajos heredados al apéndice.

CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Arnaboldi
M.P. 15533 - M.N. 13795
Dirección Técnica

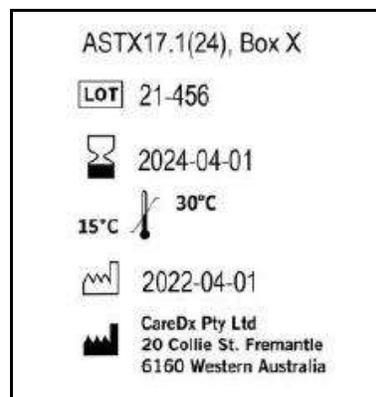
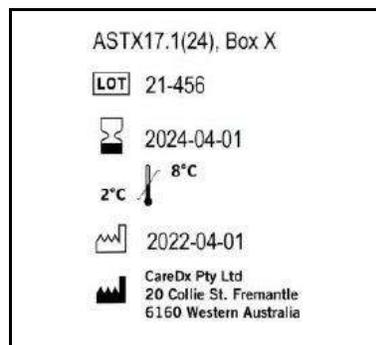
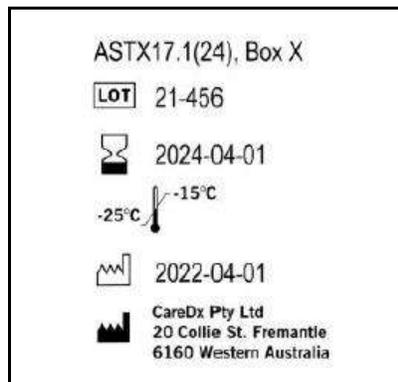
Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

		<ul style="list-style-type: none"> - Se ha actualizado la compatibilidad con versiones anteriores. - Se ha añadido el tipaje de cuatro campos de genes de clase II a las limitaciones. - Cambiar de Qarad bvba a Qarad bv. <p>Reeditado por E. Naughton el 16-dic-21</p>
6.0	15Sep2022	<p>Actualizar logotipo de Assign (eliminar TM y R). Actualizar detalles de Qarad. Añadir número de versión Se ha eliminado la referencia a los kits AlloSeq Tx y se ha actualizado la referencia a AlloSeq Tx IFU para conocer los detalles de los kits AlloSeq Tx. Características de rendimiento que deben actualizarse para reflejar todas las SKU de AlloSeq Tx. Eliminación de toda referencia a Tx 8 y ABO/CCR5 en todo el texto. Sección 9: Incorporación de detalles sobre el fabricante y el distribuidor. Incorporación de los requisitos de información de vigilancia.</p> <p>Reeditado por L. Langley 12-oct-22</p>
7.0	20 Feb 23	<p>Se ha actualizado a v1.0.4:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se ha actualizado la compatibilidad retroactiva. - Se ha actualizado la captura de pantalla de inicio. - Se ha eliminado la referencia a Tx17.1. - Se ha actualizado la captura de pantalla de la pestaña Inicio. - Capturas de pantalla de visualización de cobertura - Se han añadido detalles sobre el sombreado gris en las secuencias de referencia de los alelos, el mapa de cobertura y los seguimientos de desfase. - Se ha actualizado la secuencia de capturas de pantalla DOC. - Vista de aminoácidos - Se han actualizado las capturas de pantalla de la vista Lecturas, se ha eliminado la referencia al indicador de dirección de lectura, se ha añadido un nuevo indicador de inserción y las estrellas enlazan los pares de lecturas. - Se ha añadido una nota al informe de una sola página por muestra para describir el contenido genético y la limitación. - Se ha añadido la opción GLString sumativo a la sección de informes HML. - Se han eliminado las combinaciones de teclas duplicadas.

ROTULOS EXTERNOS

ASTX.17.1(24)-IVD y ASTX.17.1(24)-B-IVD

ETIQUETAS TRASERAS DE LAS CAJAS (según su temperatura de almacenamiento)



ETIQUETAS SUPERIORES DE LAS CAJAS

	ASTX.17.1(24)-IVD	ASTX.17.1(24)-B-IVD
Caja 1	<p>AlloSeq Tx17 REF 24 ASTX17.1(24)-IVD</p> <p>CONTENTS: 1x Tagmentation Beads 1x Tagmentation Buffer</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>	<p>AlloSeq Tx17 REF 24 ASTX17.1(24)-B-IVD</p> <p>CONTENTS: 1x Tagmentation Beads 1x Tagmentation Buffer</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>
Caja 2	<p>AlloSeq Tx17 REF 24 ASTX17.1(24)-IVD</p> <p>CONTENTS: 1x Stop Buffer 2x Tagmentation Wash Buffer</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>	<p>AlloSeq Tx17 REF 24 ASTX17.1(24)-B-IVD</p> <p>CONTENTS: 1x Stop Buffer 2x Tagmentation Wash Buffer</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>
Caja 3	<p>AlloSeq Tx17 REF 24 ASTX17.1(24)-IVD</p> <p>CONTENTS: H503, H505, H506, H517 H705, H706, H707, H710, H711, H714</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>	<p>AlloSeq Tx17 REF 24 ASTX17.1(24)-B-IVD</p> <p>CONTENTS: H502, H507, H508, H521 H701, H702, H703, H704, H712, H715</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>
Caja 4	<p>AlloSeq Tx17 REF 24 ASTX17.1(24)-IVD</p> <p>CONTENTS: 1x AlloSeqTx17 Probes, 1x PCR Mix, 1x PCR Primers 1x 2N NaOH, 1x Hybridisation Buffer 1 4x Capture Wash Buffer, 1x Capture Elution Buffer 1</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>	<p>AlloSeq Tx17 REF 24 ASTX17.1(24)-B-IVD</p> <p>CONTENTS: 1x AlloSeqTx17 Probes, 1x PCR Mix, 1x PCR Primers 1x 2N NaOH, 1x Hybridisation Buffer 1 4x Capture Wash Buffer, 1x Capture Elution Buffer 1</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>
Caja 5	<p>AlloSeq Tx17 REF 24 ASTX17.1(24)-IVD</p> <p>CONTENTS: 1x Purification Beads, 1x Capture Beads, 2x Resuspension Buffer, 1x Hybridisation Buffer 2 1x Capture Elution Buffer 2</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>	<p>AlloSeq Tx17 REF 24 ASTX17.1(24)-B-IVD</p> <p>CONTENTS: 1x Purification Beads, 1x Capture Beads, 2x Resuspension Buffer, 1x Hybridisation Buffer 2 1x Capture Elution Buffer 2</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>

Cromoion

CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Arnaboldi
M.P. 15533 • M.N. 13795
Dirección Técnica

Oscar A. García

Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

ASTX.17.1(96)-A-IVD y ASTX.17.1(96)-B-IVD

ETIQUETAS TRASERAS DE LAS CAJAS (según su temperatura de almacenamiento)

ASTX17.1(96), Box X

LOT 21-456

 2024-04-01

 -25°C -15°C

 2022-04-01

 CareDx Pty Ltd
20 Collie St. Fremantle
6160 Western Australia

ASTX17.1(96), Box X

LOT 21-456

 2024-04-01

 2°C 8°C

 2022-04-01

 CareDx Pty Ltd
20 Collie St. Fremantle
6160 Western Australia

ASTX17.1(96), Box X

LOT 21-456

 2024-04-01

 15°C 30°C

 2022-04-01

 CareDx Pty Ltd
20 Collie St. Fremantle
6160 Western Australia

ETIQUETAS SUPERIORES DE LAS CAJAS

	ASTX.17.1(96)-A-IVD	ASTX.17.1(96)-B-IVD
Caja 1	<p>AlloSeq Tx17 REF 96 ASTX17.1(96)-A-IVD</p> <p>CONTENTS: 1x Tagmentation Beads 1x Tagmentation Buffer 1x PCR Mix -1</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>	<p>AlloSeq Tx17 REF 96 ASTX17.1(96)-B-IVD</p> <p>CONTENTS: 1x Tagmentation Beads 1x Tagmentation Buffer 1x PCR Mix -1</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>
Caja 2	<p>AlloSeq Tx17 REF 96 ASTX17.1(96)-A-IVD</p> <p>CONTENTS: 2x Stop Buffer 1x Tagmentation Wash Buffer</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>	<p>AlloSeq Tx17 REF 96 ASTX17.1(96)-B-IVD</p> <p>CONTENTS: 2x Stop Buffer 1x Tagmentation Wash Buffer</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>
Caja 3	<p>AlloSeq Tx17 REF 96 ASTX17.1(96)-A-IVD</p> <p>CONTENTS: AlloSeq Tx indices Set A</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>	<p>AlloSeq Tx17 REF 96 ASTX17.1(96)-B-IVD</p> <p>CONTENTS: AlloSeq Tx indices Set B</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>
Caja 4	<p>AlloSeq Tx17 REF 96 ASTX17.1(96)-A-IVD</p> <p>CONTENTS: 1x AlloSeqTx17 Probes, 1x PCR Mix-2, 1x PCR Primers 2x 2N NaOH, 1x Hybridisation Buffer 1 8x Capture Wash Buffer, 1x Capture Elution Buffer 1</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>	<p>AlloSeq Tx17 REF 96 ASTX17.1(96)-B-IVD</p> <p>CONTENTS: 1x AlloSeqTx17 Probes, 1x PCR Mix-2, 1x PCR Primers 2x 2N NaOH, 1x Hybridisation Buffer 1 8x Capture Wash Buffer, 1x Capture Elution Buffer 1</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>
Caja 5	<p>AlloSeq Tx17 REF 96 ASTX17.1(96)-A-IVD</p> <p>CONTENTS: 3x Purification Beads-1, 1x Purification Beads-2 2x Resuspension Buffer, 1x Hybridisation Buffer 2 1x Capture Beads, 1x Capture Elution Buffer 2</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>	<p>AlloSeq Tx17 REF 96 ASTX17.1(96)-B-IVD</p> <p>CONTENTS: 3x Purification Beads-1, 1x Purification Beads-2 2x Resuspension Buffer, 1x Hybridisation Buffer 2 1x Capture Beads, 1x Capture Elution Buffer 2</p> <p>EC REP Qarad BV, Ciplastraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>

ASTX.9.1(96)-A-IVD y ASTX.9.1(96)-B-IVD

ETIQUETAS TRASERAS DE LAS CAJAS (según su temperatura de almacenamiento)

ASTX9.1(96), Box X

 21-456

 2024-04-01

 -25°C -15°C

 2022-04-01

 CareDx Pty Ltd
20 Collie St. Fremantle
6160 Western Australia

ASTX9.1(96), Box X

 21-456

 2024-04-01

 2°C 8°C

 2022-04-01

 CareDx Pty Ltd
20 Collie St. Fremantle
6160 Western Australia

ASTX9.1(96), Box X

 21-456

 2024-04-01

 15°C 30°C

 2022-04-01

 CareDx Pty Ltd
20 Collie St. Fremantle
6160 Western Australia

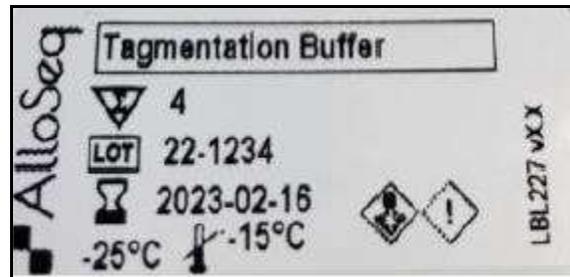
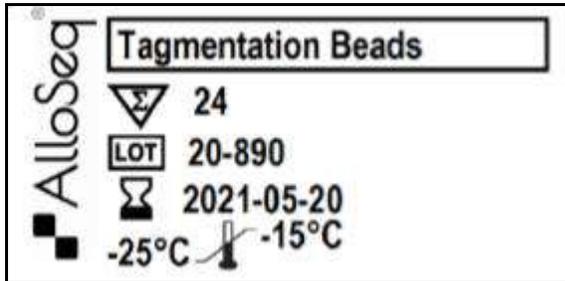
ETIQUETAS SUPERIORES DE LAS CAJAS

	ASTX.9.1(96) -A-IVD	ASTX.9.1(96) -B-IVD
Caja 1	<p>AlloSeq Tx9 REF ASTX9.1(96)-A-IVD 95</p> <p>CONTENTS: 1x Tagmentation Beads 1x Tagmentation Buffer 1x PCR Mix -1</p> <p>EC REP Qarad BV, Cipalstraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>	<p>AlloSeq Tx9 REF ASTX9.1(96)-B-IVD 96</p> <p>CONTENTS: 1x Tagmentation Beads 1x Tagmentation Buffer 1x PCR Mix -1</p> <p>EC REP Qarad BV, Cipalstraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>
Caja 2	<p>AlloSeq Tx9 REF ASTX9.1(96)-A-IVD 96</p> <p>CONTENTS: 2x Stop Buffer 1x Tagmentation Wash Buffer</p> <p>EC REP Qarad BV, Cipalstraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>	<p>AlloSeq Tx9 REF ASTX9.1(96)-B-IVD 96</p> <p>CONTENTS: 2x Stop Buffer 1x Tagmentation Wash Buffer</p> <p>EC REP Qarad BV, Cipalstraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>
Caja 3	<p>AlloSeq Tx9 REF ASTX9.1(96)-A-IVD 96</p> <p>CONTENTS: AlloSeq Tx Indices Set A</p> <p>EC REP Qarad BV, Cipalstraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>	<p>AlloSeq Tx9 REF ASTX9.1(96)-B-IVD 96</p> <p>CONTENTS: AlloSeq Tx Indices Set B</p> <p>EC REP Qarad BV, Cipalstraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>
Caja 4	<p>AlloSeq Tx9 REF ASTX9.1(96)-A-IVD 96</p> <p>CONTENTS: 1x AlloSeqTx9 Probes, 1x PCR Mix-2, 1x PCR Primers 2x 2N NaOH, 1x Hybridisation Buffer 1 8x Capture Wash Buffer, 1x Capture Elution Buffer 1</p> <p>EC REP Qarad BV, Cipalstraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>	<p>AlloSeq Tx9 REF ASTX9.1(96)-B-IVD 96</p> <p>CONTENTS: 1x AlloSeqTx9 Probes, 1x PCR Mix-2, 1x PCR Primers 2x 2N NaOH, 1x Hybridisation Buffer 1 8x Capture Wash Buffer, 1x Capture Elution Buffer 1</p> <p>EC REP Qarad BV, Cipalstraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>
Caja 5	<p>AlloSeq Tx9 REF ASTX9.1(96)-A-IVD 96</p> <p>CONTENTS: 3x Purification Beads-1, 1x Purification Beads-2 2x Resuspension Buffer, 1x Hybridisation Buffer 2 1x Capture Beads, 1x Capture Elution Buffer 2</p> <p>EC REP Qarad BV, Cipalstraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>	<p>AlloSeq Tx9 REF ASTX9.1(96)-B-IVD 96</p> <p>CONTENTS: 3x Purification Beads-1, 1x Purification Beads-2 2x Resuspension Buffer, 1x Hybridisation Buffer 2 1x Capture Beads, 1x Capture Elution Buffer 2</p> <p>EC REP Qarad BV, Cipalstraat 3, 2440, Geel, Belgium www.caredx.com IVD CE 0197</p>

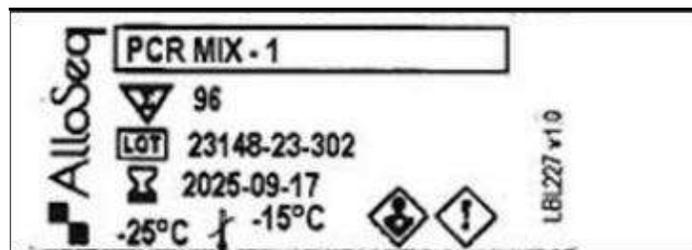
ROTULOS INTERNOS

Componentes de caja 1

- Para ASTX.17.1(24)-IVD, ASTX.17.1(24)-B-IVD, ASTX.17.1(96)-A-IVD, ASTX.17.1(96)-B-IVD, ASTX.9.1(96)-A-IVD y ASTX.9.1(96)-B-IVD:

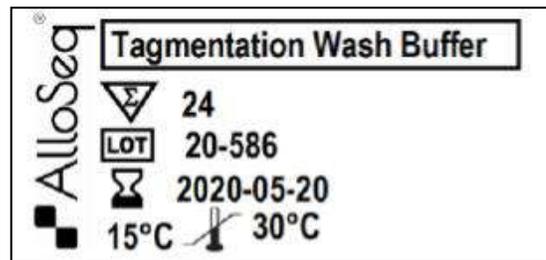
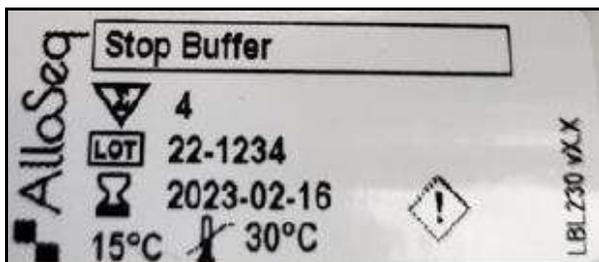


- Sólo para ASTX.17.1(96)-A-IVD, ASTX.17.1(96)-B-IVD, ASTX.9.1(96)-A-IVD y ASTX.9.1(96)-B-IVD:



Componentes de caja 2

- Para ASTX.17.1(24)-IVD, ASTX.17.1(24)-B-IVD, ASTX.17.1(96)-A-IVD, ASTX.17.1(96)-B-IVD, ASTX.9.1(96)-A-IVD y ASTX.9.1(96)-B-IVD:



Componentes de caja 3

- Sólo para ASTX.17.1(24)-IVD:

AlloSeq[®] H503
24
LOT 20-644
2020-05-20
-25°C -15°C

AlloSeq[®] H505
24
LOT 20-644
2020-05-20
-25°C -15°C

AlloSeq[®] H506
24
LOT 20-649
2020-05-20
-25°C -15°C

AlloSeq[®] H517
24
LOT 20-659
2020-05-20
-25°C -15°C

AlloSeq[®] H705
24
LOT 20-688
2020-05-18
-25°C -15°C

AlloSeq[®] H706
24
LOT 20-689
2020-05-20
-25°C -15°C

AlloSeq[®] H707
24
LOT 20-681
2020-05-20
-25°C -15°C

AlloSeq[®] H710
24
LOT 20-682
2020-05-20
-25°C -15°C

AlloSeq[®] H711
24
LOT 20-683
2020-05-20
-25°C -15°C

AlloSeq[®] H714
24
LOT 20-684
2020-05-20
-25°C -15°C

- Sólo para ASTX.17.1(24)-B-IVD:

AlloSeq[®] H502
24
LOT 21-234
2022-05-18
-25°C -15°C

AlloSeq[®] H507
24
LOT 21-234
2022-05-18
-25°C -15°C

AlloSeq[®] H508
24
LOT 21-234
2022-05-18
-25°C -15°C

AlloSeq® **H521**
 ▽ 24
 LOT 21-234
 2022-05-18
 -25°C -15°C

AlloSeq® **H701**
 ▽ 24
 LOT 21-234
 2022-05-18
 -25°C -15°C

AlloSeq® **H702**
 ▽ 24
 LOT 21-234
 2022-05-18
 -25°C -15°C

AlloSeq® **H703**
 ▽ 24
 LOT 21-234
 2022-05-18
 -25°C -15°C

AlloSeq® **H704**
 ▽ 24
 LOT 21-234
 2022-05-18
 -25°C -15°C

AlloSeq® **H712**
 ▽ 24
 LOT 21-234
 2022-05-18
 -25°C -15°C

AlloSeq® **H715**
 ▽ 24
 LOT 21-234
 2022-05-18
 -25°C -15°C

- Sólo para ASTX.17.1(96)-A-IVD y ASTX.9.1(96)-A-IVD:

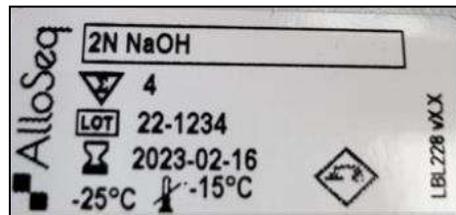
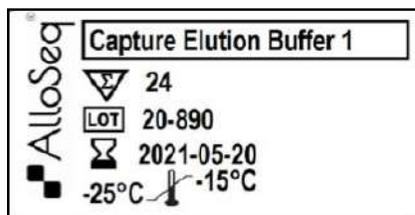
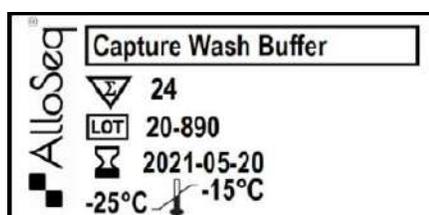
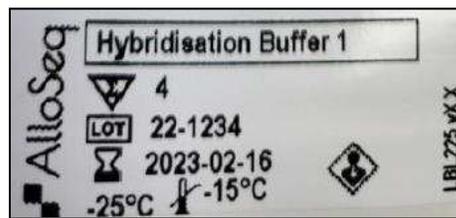
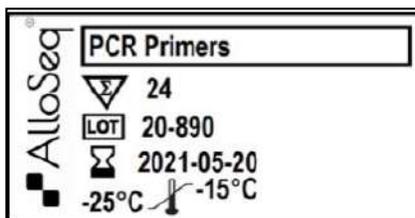
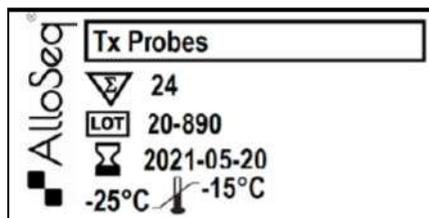
AlloSeq Tx Indices Set A
 15501392
 2021-11-06 2024-05-06
 -25°C -15°C

- Sólo para ASTX.17.1(96)-B-IVD y ASTX.9.1(96)-B-IVD

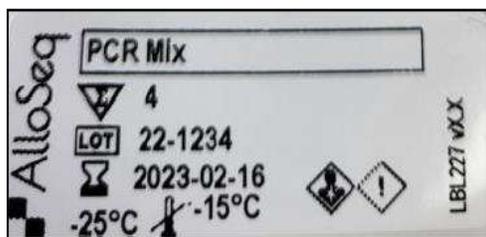
AlloSeq Tx Indices Set B
 15501533
 2021-11-06 2024-05-06
 -25°C -15°C

Componentes de caja 4

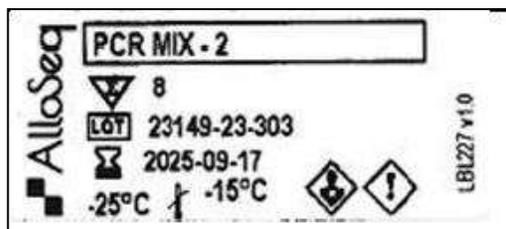
- Para ASTX.17.1(24)-IVD, ASTX.17.1(24)-B-IVD, ASTX.17.1(96)-A-IVD, ASTX.17.1(96)-B-IVD, ASTX.9.1(96)-A-IVD y ASTX.9.1(96)-B-IVD:



- Sólo para ASTX.17.1(24)-IVD, ASTX.17.1(24)-B-IVD:

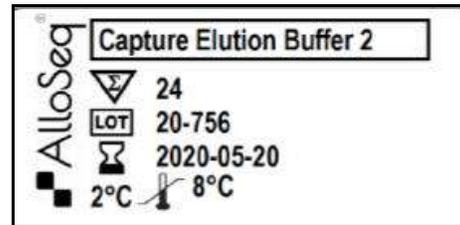
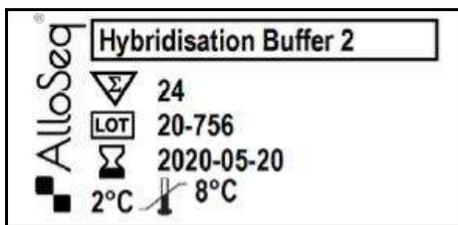
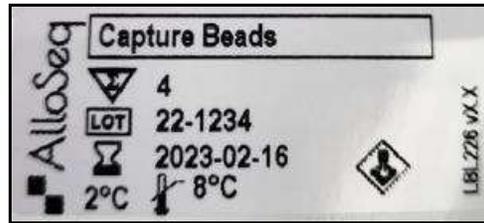
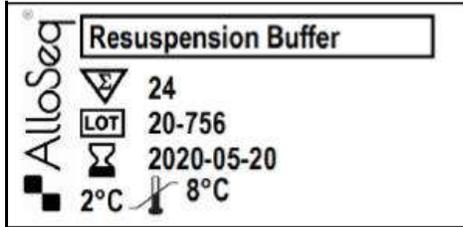


- Sólo para ASTX.17.1(96)-A-IVD, ASTX.17.1(96)-B-IVD, ASTX.9.1(96)-A-IVD y ASTX.9.1(96)-B-IVD:

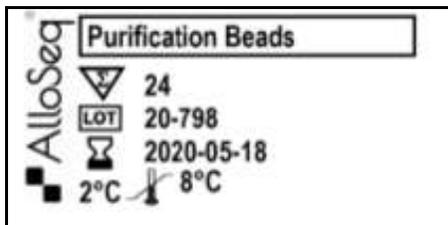


Componentes de caja 5

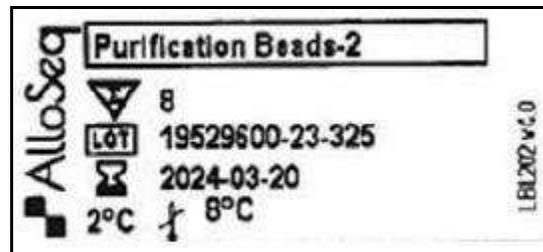
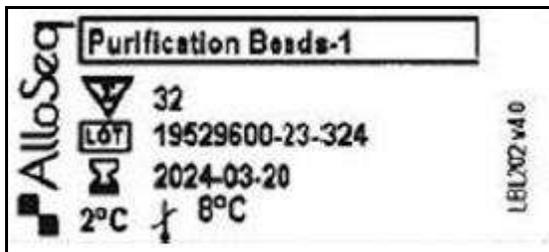
- Para ASTX.17.1(24)-IVD, ASTX.17.1(24)-B-IVD, ASTX.17.1(96)-A-IVD, ASTX.17.1(96)-B-IVD, ASTX.9.1(96)-A-IVD y ASTX.9.1(96)-B-IVD:



- Sólo para ASTX.17.1(24)-IVD, ASTX.17.1(24)-B-IVD:



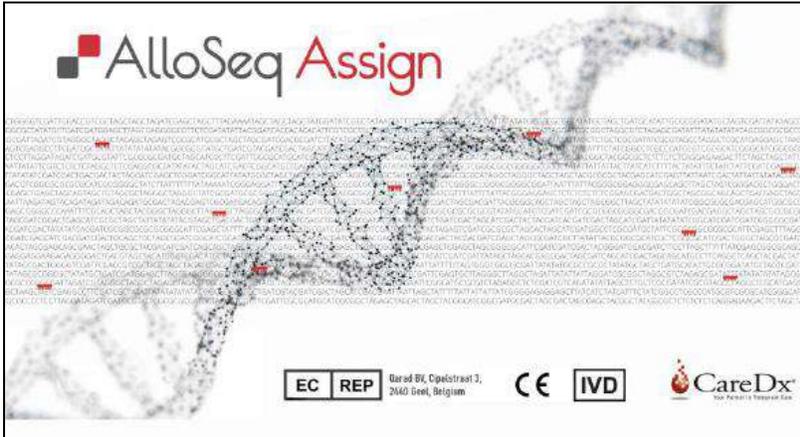
- Sólo para ASTX.17.1(96)-A-IVD, ASTX.17.1(96)-B-IVD, ASTX.9.1(96)-A-IVD y ASTX.9.1(96)-B-IVD:



CROMOION s.r.l.
Farm. Cecilia A. Arnaboldi
M.P. 15533 • M.N. 13795
Dirección Técnica

Oscar A. García
Socio gerente
Cromoion

AlloSeq Assign



About AlloSeq Assign ✕

AlloSeq Assign 1.0.4.1395

For use with AlloSeq Tx Sequencing Panel Assays.

© 2019, CareDx Inc. All rights reserved.
 Manufactured by CareDx Pty Ltd.
 20 Colлие St, Fremantle, WA 6160, Australia.
 Not for resale.

Instructions for Use, Product Information, Product Updates and Technical Support available on: <http://www.caredx.com/>

CE IVD REF ASA1.0

SOBRE RÓTULO QUE SE AGREGA A LAS CAJAS DE LOS PRODUCTOS

IMPORTADOR/DISTRIBUIDOR: CROMOION S.R.L.
 Oporto 6125 (C1408CEA) C.A.B.A. – Argentina
 Tel./Fax (011) 4644-3205/06
 Legajo empresa 908
 Directora Técnica: Dra. Cecilia Arnaboldi - M.N. 13795
 Producto Médico – Venta exclusiva a Laboratorios de Análisis Clínicos
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
 Uso Diagnóstico In Vitro

Certif./PM: **908-248**
 Autorizado por la ANMAT
 Ministerio de Salud – República Argentina
VER INSTRUCCIONES DE USO

Cecilia Arnaboldi
CROMOION s.r.l.
 Farm. Cecilia A. Arnaboldi
 M.P. 15533 - M.N. 13795
 Dirección Técnica

Oscar A. García
Oscar A. García
 Socio gerente
 Cromoion



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: CROMOION SRL.

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 106 pagina/s.

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.05.29 11:19:09 -03:00

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.05.29 11:19:15 -03:00



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Certificado - Redacción libre

Número:

Referencia: 1-0047-3110-002043-24-3

**CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN
PRODUCTO MÉDICO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO**

Expediente Nº 1-0047-3110-002043-24-3

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que de acuerdo con lo solicitado por CROMOION S.R.L. ; se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), de un nuevo producto con los siguientes datos identificatorios característicos:

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

Nombre Descriptivo: AlloSeq, para la determinación de antígenos HLA clase I y II

Marca comercial: AlloSeq

Modelos:

Alloseq Tx 17 / AlloSeq Tx 9 / AlloSeq Assign

Indicación/es de uso:

- AlloSeq Tx 17 / AlloSeq Tx 9: Utilizados para la secuenciación de genes dirigidos, diseñados para ayudar a determinar la compatibilidad genética entre pacientes de trasplante y posibles donantes.

- AlloSeq Assign: Utilizado para ayudar en la asignación de un genotipo tras el enriquecimiento selectivo y la secuenciación utilizando los kits de reactivos AlloSeq Tx. El software Assign importa los datos de la secuencia, realiza la alineación de la secuencia, permite la edición de la secuencia y luego compara una secuencia de consenso con una librería de secuencias de alelos.

Forma de presentación: - AlloSeq Tx 17: ASTX17.1(24)-IVD y ASTX17.1(24)-B-IVD: hasta 24 muestras / ASTX17.1(96)-A-IVD y ASTX17.1(96)-B-IVD: hasta 96 muestras

- AlloSeq Tx 9: ASTX9.1(96)-A-IVD y ASTX9.1(96)-B-IVD: hasta 96 muestras

- AlloSeq Assign, software

Período de vida útil: - Reactivos Caja 1 de 5, almacenar a -15 a -25 °C: Tagmentation Beads / Tagmentation Buffer / PCR Mix-1

- Reactivos Caja 2 de 5, almacenar a 15 a 30 °C: Stop Buffer / Tagmentation Wash Buffer

- Reactivos Caja 3 de 5, almacenar a -15 a -25 °C: Cebadores de indexación AlloSeq Tx

- Reactivos, caja 4 de 5, almacenar de -15 a -25 °C: AlloSeq Tx Probes / PCR Primers / Hybridisation Buffer 1 / Capture Wash Buffer / Capture Elution Buffer 1 / 2N NaOH / PCR Mix / PCR Mix-2

- Reactivos Caja 5 de 5, almacenar a 2-8 °C: Resuspension Buffer / Capture Beads / Hybridisation Buffer 2 / Capture Elution Buffer 2 / Purification Beads / Purification Beads-1 / Purification Beads -2

- AlloSeq Assign: no aplica

Nombre del fabricante:

CareDx Pty Ltd.

Lugar de elaboración:

220 Collie Street, Fremantle 6160, Western Australia - AUSTRALIA

Grupo de Riesgo: Grupo C

Condición de uso: Uso profesional exclusivo

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del PRODUCTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO PM 908-248 , con una vigencia de cinco (5) años a partir de la fecha de la Disposición autorizante.

N° 1-0047-3110-002043-24-3

N° Identificadorio Trámite: 57591

AM

Digitally signed by PEARSON Enriqueta María
Date: 2024.06.03 18:28:23 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.06.03 18:28:25 -03:00