



AlloSeq HCT

Instrucciones de uso

IFU100-ES

N.º de versión: 1.0

Fecha de emisión: marzo de 2024



ASHCT.1(96)-IVD



CareDx Pty Ltd
20 Collie Street
Fremantle, WA 6160
Australia



CareDx AB
Franzégatan 5
112 51 Estocolmo
Suecia



Qarad BV
Cipalstraat 3
2440 Geel
Bélgica



Qarad Suisse S.A.
World Trade Center, Avenue Gratta-Paille 2
1018 Lausana
Suiza
CHRN: CHRN-AR-20002058



Índice

1.	Introducción	3
1.1.	Principio	3
1.2.	Uso previsto	4
1.3.	Limitaciones y contraindicaciones	5
1.4.	Definiciones.....	5
1.5.	Sustancias que interfieren	6
1.6.	Características del rendimiento	7
1.7.	Precisión.....	7
1.8.	Especificidad	7
1.9.	Reproducibilidad y repetibilidad (precisión).....	7
1.10.	Límite de detección/rango de medición	7
1.11.	Intervalo de medición	7
1.12.	Asunciones	7
2.	Flujo de trabajo de preparación de la biblioteca AlloSeq HCT	8
2.1.	Consideraciones sobre la muestra	8
2.2.	Amplificación de PCR multiplexada de un solo paso	8
	Antes de empezar	8
	Procedimiento.....	9
2.3.	Limpieza de la biblioteca y determinación de la concentración.....	10
	Antes de empezar	10
	Procedimiento.....	11
3.	Flujo de trabajo de secuenciación	13
3.1.	Desnaturalización y dilución de bibliotecas para secuenciación	13
	Antes de empezar	13
	Procedimiento (sin control PhiX)	14
	Procedimiento (con control PhiX).....	14
4.	Información adicional	15
4.1.	Contenido y requisitos de almacenamiento del AlloSeq HCT Kit	15
4.2.	Seguridad de AlloSeq HCT.....	15
4.3.	Se requieren consumibles y equipos adicionales	17
4.4.	Referencias relevantes.....	18
5.	Información del contacto.....	18
6.	Referencias.....	19

1. Introducción

En estas instrucciones de uso (IU) se describen los pasos necesarios para preparar una biblioteca para la secuenciación utilizando el kit AlloSeq HCT con el fin de generar datos para su análisis utilizando el software AlloSeq HCT. El software y el kit de reactivos forman parte del producto AlloSeq HCT.

1.1. Principio

El kit de reactivos AlloSeq HCT y el software AlloSeq HCT (denominados de manera colectiva AlloSeq HCT) forman un sistema que permite la cuantificación relativa del quimerismo genético en una muestra de ADN derivada de un receptor de trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH). Las células madre hematopoyéticas derivadas de donantes tienen un genoma distinto en comparación con las células madre hematopoyéticas del receptor. Después del TCMH, las células trasplantadas reconstruyen la médula ósea y el sistema sanguíneo del receptor; sin embargo, se pueden detectar células del donante y del receptor a diferentes niveles después del TCMH, lo que genera quimerismo genético en el receptor.

AlloSeq HCT es un ensayo dirigido de secuenciación de próxima generación (SPG) que utiliza diferencias en el polimorfismo de un solo nucleótido (PSN) para medir la cantidad de ADN derivado del receptor y del donante presente en una muestra posterior al trasplante. Cada kit de reactivos contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación multiplexada de 202 loci por muestra. Cada amplicón cubre un PSN único, que se distribuye por todos los cromosomas autosómicos humanos. Los amplicones completos listos para el secuenciador se generan en un solo paso de amplificación y contienen la región objetivo, índices específicos de muestra duales y adaptadores de la celda de flujo, como se muestra en la Figura 1. Una vez que se generan y agrupan todas las bibliotecas de muestras, la biblioteca resultante pasa por una limpieza de perlas magnéticas para eliminar los cebadores no utilizados, seguida de una cuantificación. A continuación, se sigue el flujo de trabajo de Illumina MiSeq para preparar la biblioteca para la secuenciación. La reacción de secuenciación se realiza utilizando el MiSeq v3 Reagent Kit que utiliza una lectura de extremo emparejado de 75 pb y un código de barras dual. Se prepara una hoja de muestra para la reacción de secuenciación y se realiza el análisis de los datos de los archivos fastq resultantes utilizando el software AlloSeq HCT.

El software AlloSeq HCT cuenta con un algoritmo propio que permite la resolución de hasta 3 genomas distintos (contribuyentes genéticos) presentes en una sola muestra posterior al trasplante (1 receptor y hasta 2 donantes). Se requiere información del genotipo previo al trasplante generada con AlloSeq HCT para los 3, o al menos 2, de los contribuyentes genéticos presentes en la muestra posterior al trasplante y se puede realizar antes o al mismo tiempo que el análisis de las muestras posteriores al trasplante. A partir de un algoritmo propio que utiliza las frecuencias poblacionales conocidas de los PSN secuenciados y las distribuciones esperadas de los alelos, se calculan los porcentajes de los diferentes genomas presentes en una sola muestra. El proceso del análisis de los datos está automatizado con menos de 20 minutos de tiempo de manipulación. Una interfaz intuitiva muestra el % de fracción de ADN de cada contribuyente genético presente en una muestra posterior al trasplante. Además, se pueden generar archivos de salida compatibles con Excel y se pueden integrar con sistemas LIMS para agilizar la elaboración de informes. Para obtener más información sobre cómo realizar el análisis de los datos, consulte las IU del software AlloSeq HCT.

El producto AlloSeq HCT ofrece las siguientes funciones y prestaciones técnicas:

- Tiempo de respuesta rápido con:
 - Tiempo de respuesta de 3 horas para la preparación de la biblioteca
 - 3 horas de tiempo de manipulación
 - ADN para dar como resultado hasta 24 horas
- Software de análisis de datos automatizado
- Compatible con el instrumento Illumina MiSeq y el MiSeq v3 Reagent Kit (150 ciclos)
- Capacidad de secuenciación flexible con bibliotecas que contienen entre 8 y 48 muestras por ejecución
- Precisa una baja introducción de ADN de 10 ng y una concentración mínima de 0,625 ng/μL

- Rendimiento técnico evaluado con el uso del control de secuenciación Illumina PhiX v3 al 1 %
- Alta sensibilidad que presenta un límite inferior de cuantificación (evaluado como se describe en «Protocolos para la determinación de los límites de detección y los límites de cuantificación», CLSI octubre de 2004) del 0,36 % para muestras posteriores al trasplante con dos donantes.
- Variabilidad de presentación de alta precisión:
 - entre experimentos equivalente al 1,7 % con una fracción de ADN del 10 % y al 6,5 % con una fracción de ADN del 1 %
 - dentro de los experimentos equivalente al 1,3 % con una fracción de ADN del 10 % y al 4,7 % con una fracción de ADN del 1 %
- Alta precisión entre la determinación de la fracción de ADN esperada y observada con un $R^2 > 0,999$

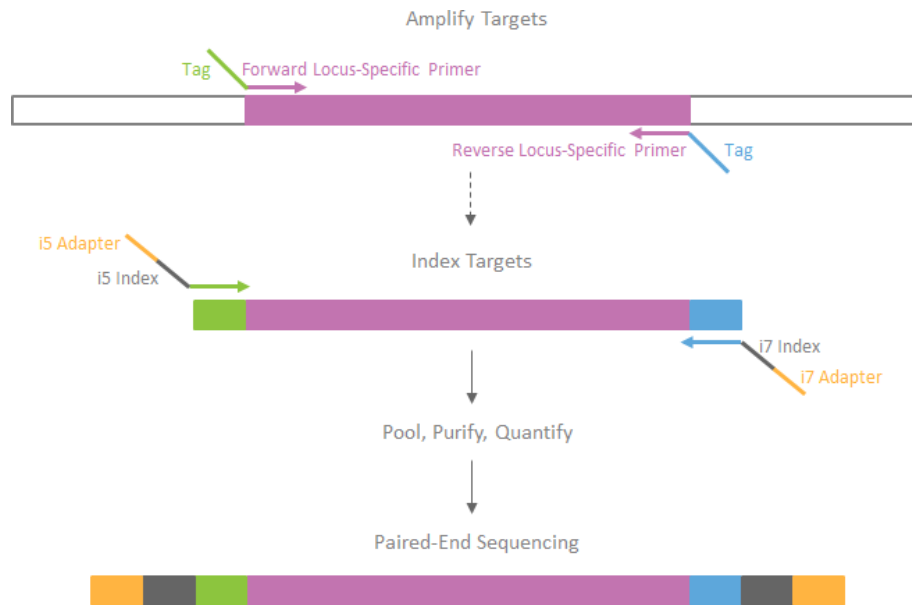


FIGURA 1. EL PASO ÚNICO DE AMPLIFICACIÓN INCLUYE EL USO DE CEBADORES QUE SON ESPECÍFICOS DEL OBJETIVO Y CONTIENEN CÓDIGOS DE BARRAS DE MUESTRA (ÍNDICES I5 E I7) Y ADAPTADORES DE SECUENCIADOR (ADAPTADORES I5 E I7) PARA GENERAR AMPLICONES LISTOS PARA EL SECUENCIADOR EN UN SOLO PASO. LA BIBLIOTECA RESULTANTE ESTÁ LISTA PARA LA PURIFICACIÓN CON

1.2. Uso previsto

El kit y el software AlloSeq HCT son pruebas diagnósticas *in vitro* semicuantitativas para la supervisión del quimerismo de muestras alogénicas de receptores de TCMH posteriores al trasplante, en las que el quimerismo mixto (QM) implica el fracaso del injerto con la presencia de células hemopoyéticas del donante y del receptor. Las muestras se purifican con ADNg de la sangre de los pacientes trasplantados, de la sangre del donante y del receptor (paciente trasplantado antes del trasplante).

El producto está diseñado para su uso con los instrumentos de secuenciación Illumina MiSeq, junto con el software AlloSeq HCT.

El producto está diseñado para su uso por personal debidamente formado en laboratorios regulados.

Los productos AlloSeq HCT están indicados solo para el uso profesional y no deben utilizarse como única base para la toma de decisiones clínicas. Los productos AlloSeq HCT no se utilizan para el diagnóstico de enfermedades.

1.3. Limitaciones y contraindicaciones

El producto AlloSeq HCT se utiliza para calcular el porcentaje de ADN (% de ADN) de hasta tres genomas distintos presentes en muestras de TCMH posteriores al trasplante.

NO UTILICE AlloSeq HCT en receptores de trasplantes que:

- se hayan sometido a procedimientos de TCMH que impliquen a 3 o más donantes genéticamente distintos
- hayan recibido un trasplante de un gemelo monocigótico (idéntico)
- hayan recibido una transfusión de sangre que contenga glóbulos blancos en los últimos 30 días (los glóbulos rojos lavados o leucorreducidos son aceptables)

1.4. Definiciones

En esta sección se proporcionan definiciones de acrónimos y conceptos que son útiles para comprender las instrucciones para preparar una biblioteca de secuenciación con AlloSeq HCT.

Acrónimo/término	Definición
Muestra posterior al trasplante	Se refiere al ADN extraído de una muestra biológica de sangre o médula ósea, de un individuo después de haber sido sometido a un TCMH con el fin de realizar un análisis del quimerismo genético. Dado que la fuente tisular presentará células del(de los) donante(s) y del receptor, el ADN extraído contendrá una mezcla de genomas humanos distintos que se pueden evaluar con AlloSeq HCT.
Contribuyentes genéticos	Cada genoma distinto presente en una muestra posterior al trasplante.
Locus	Ubicación específica en un genoma.
Amplión	El producto de PCR del ensayo AlloSeq HCT que representa una región genómica y que contiene un PSN bialélico del total de 202 PSN.
Genotipo	Se refiere a la información genética recopilada para las muestras de ADN mediante AlloSeq HCT para los 202 PSN objeto del ensayo.
Archivos Fastq	Datos generados por el instrumento Illumina MiSeq y utilizados en el análisis de los datos para el cálculo del % de ADN. Cada muestra está asociada a un par de archivos fastq (R1 y R2, lecturas directa e inversa, respectivamente) que contienen las lecturas secuenciadas de una muestra biológica preparada con el ensayo AlloSeq HCT.
Hoja de muestra	Archivo con extensión .csv que recopila la información necesaria para la secuenciación en el MiSeq y el análisis de los datos en el software AlloSeq HCT.
% de ADN	El porcentaje calculado de la fracción de ADN para cada contribuyente genético presente en una muestra posterior al trasplante.
Análisis de los datos	Procesamiento de archivos fastq en estimaciones de % de ADN y cálculo de parámetros de calidad y rendimiento.
Donante único	Una muestra posterior al trasplante que se espera que contenga dos genomas distintos presentes porque se deriva de un receptor de TCMH con un solo donante de células hematopoyéticas.
Dos donantes	Una muestra posterior al trasplante que se espera que contenga tres genomas distintos presentes porque se deriva de un receptor de TCMH con un total de dos donantes de células hematopoyéticas.

1.5. Sustancias que interfieren

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 EDTA <1 mM. Utilice kits comerciales de preparación de ADN sanguíneo o evite los tubos de extracción de sangre con EDTA
Alcoholes	Etanol, isopropanol, alcohol isoamílico	Baja	Asegúrese de que los pellets o perlas de ADN se sequen al aire y se inspeccionen visualmente en busca de gotas de etanol (etanol al 1 % = 1,25 ul de etanol al 80 % en una reacción de PCR de 100 ul). Hay múltiples pasos de lavado con etanol al 80 % en el protocolo AlloSeq HCT, lo que hace que la inhibición debida a los residuos de etanol sea un riesgo bajo, pero ligeramente mayor que otros factores.
Exceso de sales	KCl, NaCl, CsCl, NaAc	Muy bajo	Asegúrese de lavar a fondo los pellets o perlas de ADN con etanol al 80 %. Asegúrese de que OD 260/230 inicie el ADN genómico ~2
Sales caotrópicas	Cloruro de guanidinio; MgCl ₂ ; urea	Muy bajo	Asegúrese de lavar a fondo los pellets o perlas de ADN con etanol al 80 %. Asegúrese de que OD 260/230 inicie el ADN genómico ~2
Fenol: cloroformo	Residuos orgánicos	Muy bajo	Un componente del procedimiento comercial de extracción de ADN Trizol ampliamente utilizado. Asegúrese de lavar a fondo los pellets o perlas de ADN con etanol al 80 %. Asegúrese de que OD 260/230 inicie el ADN genómico ~2
Proteínas	BSA, PEG, albúmina en sangre	Muy bajo	Utilice kits comerciales de preparación de ADN sanguíneo. Asegúrese de que OD 260/280 inicie el ADN genómico >1,8
Hemo, hemoglobina, inmunoglobulinas.	Sangre	Muy bajo	Evite el uso de muestras de sangre que presenten hemólisis grave. Utilice kits comerciales de preparación de ADN sanguíneo. Asegúrese de que OD 260/280 inicie el ADN genómico >1,8
Detergentes/TDT	Na desoxicolato, sarkosyl, SDS, NP40, polisorbato 20, Tritón X-100, N-octilglucósido	Muy bajo	Asegúrese de lavar a fondo los pellets o perlas de ADN con etanol al 80 %. Asegúrese de que OD 260/230 inicie el ADN genómico ~2
Proteasas	Proteinasa K, manipulación de muestras	Muy bajo	Utilice kits comerciales de preparación de ADN sanguíneo o saliva. Utilice el EPI adecuado en todo momento
Nucleasas	Manipulación de muestras, enzimas de restricción, nucleasa microcócica	Muy bajo	Utilice kits comerciales de preparación de ADN sanguíneo. Utilice el EPI adecuado en todo momento
ADN/ARN exógeno	Residuos, contaminación	Muy bajo	Prepare el ADN genómico en un área dedicada previa a la PCR
Portadores	ARN, heparina, glucógeno	Muy bajo	Utilice kits comerciales de preparación de ADN sanguíneo o evite los tubos de extracción de sangre con heparina
Exceso de iones metálicos	Mg ²⁺ a partir de tampón de PCR, iones de Fe	Muy bajo	Asegúrese de lavar a fondo los pellets o perlas de ADN con etanol al 80 %. Asegúrese de que OD 260/230 inicie el ADN genómico ~2
Medicamentos antivirales (por ejemplo, aciclovir)	Sangre	Muy bajo	Utilice kits comerciales de preparación de ADN sanguíneo. Asegúrese de que OD 260/280 inicie el ADN genómico >1,8
Polvo de guantes	Guantes empolvados	Muy bajo	Utilice guantes sin polvo
Tubos de PCR irradiados con radiación UV	Tratamiento UV de tubos de PCR	Muy bajo	Evite el tratamiento UV de los artículos de plástico

1.6. Características del rendimiento

Se evaluó el rendimiento del ensayo utilizando muestras de control de ADNg de un solo genoma obtenidas de SeraCare, ADNg de voluntarios sanos y un panel de mezclas de ADNg compuesto por los controles de SeraCare. Se evaluó el rendimiento del ensayo con respecto a los criterios de aceptación definidos.

1.7. Precisión

Los productos AlloSeq HCT, incluido el kit y el software HCT(96), están diseñados para la cuantificación del quimerismo. En los estudios de verificación y evaluación del rendimiento, los productos AlloSeq HCT se utilizaron para evaluar la cuantificación del quimerismo de los controles de un solo genoma, un panel de mezclas de múltiples genomas y muestras clínicas de receptores, donantes y posteriores al trasplante. Los resultados del quimerismo de AlloSeq HCT demuestran una fuerte correlación positiva con los de otros métodos de prueba del quimerismo estándar del sector (basados en NGS y STR) para muestras clínicas, con un valor R^2 de 0,9991.

1.8. Especificidad

En el contexto del ensayo AlloSeq HCT, la especificidad se define como el porcentaje de lecturas de secuenciación que se asignan a los loci objetivo. Los datos de verificación demostraron una especificidad media del 97,43 % (el valor mínimo observado fue del 90,17 % y el máximo del 98,78 %).

1.9. Reproducibilidad y repetibilidad (precisión)

Se ha demostrado que los productos AlloSeq HCT producen resultados equivalentes en todos los lotes en los estudios de verificación, y entre usuarios, instrumentos y laboratorios en los estudios de verificación y evaluación del rendimiento. Se ha demostrado que los productos AlloSeq HCT producen resultados equivalentes para las mismas muestras en ejecuciones repetidas, con coeficientes de variación (CV) inferiores al 15 % para todas las muestras por encima del LDD del ensayo.

1.10. Límite de detección/rango de medición

Con la introducción recomendada de 10 ng de ADNg, el límite de detección (LDD) para AlloSeq HCT es del 0,22 %. El límite de blanco (LdB) y el límite de cuantificación (LdC) son 0,13 y 0,36 %, respectivamente.

1.11. Intervalo de medición

El ensayo AlloSeq HCT se ha validado con los intervalos de medición requeridos del 0 a 100 % (con genotipo del receptor o del donante) para distinguir con éxito entre el ADN del donante y el del receptor dentro de una muestra determinada. El ensayo se ha validado en muestras quiméricas dentro del rango de 0,05-60,00 %.

1.12. Asunciones

- Los instrumentos están debidamente calibrados, mantenidos y sujetos a un plan de mantenimiento, según sea necesario.
- Se han establecido Procedimientos Operativos Estándar (SOP, por sus siglas en inglés) y están controlados.
- El kit lo utiliza personal de laboratorio formado y autorizado.
- Los reactivos se utilizan dentro de las fechas de caducidad 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 requeridos en este documento.
- Se tiene cuidado para evitar la contaminación cruzada de las muestras de ADN o la mezcla de las muestras.

2. Flujo de trabajo de preparación de la biblioteca AlloSeq HCT

En este apartado se describe el flujo de trabajo de AlloSeq HCT desde la muestra de ADN hasta la biblioteca final, incluidas las consideraciones sobre la muestra de ADN, la amplificación por PCR, los pasos de limpieza y de determinación de la concentración.

2.1. Consideraciones sobre la muestra

Se recomienda utilizar muestras de ADN de alta calidad en el procedimiento de preparación de la biblioteca. La calidad del ADN en este contexto se define por las relaciones de lectura de absorbancia obtenidas con un espectrofotómetro de bajo volumen como NanoDrop. A continuación se muestran los valores de referencia para ADN puro y de alta calidad en las siguientes proporciones:

1. Abs a 260/230 nm: 2-2,2
2. Abs a 260/280 nm: 1,8

Si bien el ensayo es tolerante a un ADN de menor calidad, los parámetros de secuenciación, en concreto la cobertura media, se verán afectados si una muestra determinada en una biblioteca es de menor calidad en comparación con el resto.

Es fundamental cuantificar la concentración de ADN de las muestras antes de comenzar el protocolo. Recomendamos utilizar Qubit™ como método de cuantificación fluorométrica o métodos equivalentes que empleen colorantes de unión del ADN bicatenario, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada muestra de ADN que se va a analizar debe tener una concentración normalizada a 0,625 ng/μL utilizando agua de grado PCR para cumplir con el requisito de introducción de 10 ng en un volumen de 16 μL.

2.2. Amplificación de PCR multiplexada de un solo paso

En esta sección se describen los pasos que se deben seguir para configurar la PCR para la amplificación de 202 regiones objetivo por muestra. El producto final es un conjunto de 202 amplicones que contienen la región objetivo, las secuencias de índices específicos de la muestra y las secuencias de adaptadores de la celda de flujo, por muestra.

Antes de empezar

1. Confirme el contenido del kit, la temperatura de almacenamiento adecuada y asegúrese de tener los consumibles y el equipo necesarios.
2. Asegúrese de leer y seguir el manual de instrucciones del fabricante para programar los instrumentos de ciclo térmico. Los instrumentos admitidos para este flujo de trabajo son:
 - a) Sistema GeneAmp PCR 9700 (Thermo Fisher);
 - b) Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher),
 - c) SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher),
 - d) Mastercycler® Nexus Gradient (Eppendorf)
3. Siga el protocolo AlloSeq HCT en el orden que se muestra utilizando los parámetros especificados.
4. Prepare la hoja de muestra para la secuenciación (consulte las IU del software AlloSeq HCT para conocer las instrucciones).
5. Programe el termociclador creando un protocolo con los parámetros específicos:
 - a) Volumen de reacción: 40 μL
 - b) Opción de precalentar la tapa a 100 °C
 - c) Protocolo de ciclado de PCR enumerado en la Tabla 1
 - Se requieren ajustes específicos de velocidad de aumento de temperatura para los pasos que tienen un asterisco en la Tabla 1. Los equivalentes de la velocidad de aumento de temperatura para los instrumentos termocicladores soportados se enumeran en la Tabla 2.

- El protocolo general de ciclado de PCR se ilustra en la Figura 2.

6. Reactivos necesarios para la configuración de PCR:

- AlloSeq HCT PCR Mix, caja 1 almacenada entre -15 y -25 °C
- AlloSeq HCT PCR Enzyme, caja 1 almacenada entre -15 y -25 °C
- AlloSeq HCT SNP Primer Pool, caja 1 almacenada entre -15 y -25 °C
- AlloSeq HCT Index Plate, caja 2 almacenada entre -15 y -25 °C

NOTA: Descongele la placa congelada de 96 índices, agite brevemente en vórtice para mezclar y luego centrifugue rápidamente las mezclas de índices antes de pipetear para la reacción de PCR.

NOTA: Utilice 48 índices alternativos entre las ejecuciones de MiSeq.

7. Asegúrese de que las muestras de ADN que se vayan a utilizar en la preparación de la biblioteca estén normalizadas a una concentración final de 0,625 ng/μl y a un volumen mínimo de 18 μl para permitir el pipeteo de 16 μl en la placa de PCR final.

Temperatura	Duración	Velocidad de aumento de temperatura	Ciclos
98 °C	3 min	Velocidad de aumento de temperatura por defecto	1
96 °C	15 s	Velocidad de aumento de temperatura por defecto	8
70 °C	5 s		
57 °C*	60 s		
72 °C*	30 s	*Utilice la velocidad de aumento de temperatura adecuada para su termociclador según lo indicado en la Tabla 2.	
96 °C	15 s	Velocidad de aumento de temperatura por defecto	12
72 °C	60 s		
72 °C	2 min	Velocidad de aumento de temperatura por defecto	1
10 °C	∞	Velocidad de aumento de temperatura por defecto	1

TABLA 1. PCR CYCLING PROTOCOL

Termocicladores compatibles	Equivalente a la velocidad de aumento de temperatura
Sistema GeneAmp PCR 9700	25 %
Veriti Thermal Cycler	18 %
ABI SimpliAmp	0,7 °C/s
Eppendorf Nexus (bloque de aluminio)	0,4 °C/s

TABLA 2. VELOCIDADES DE AUMENTO DE TEMPERATURA DEL TERMOCICLADOR

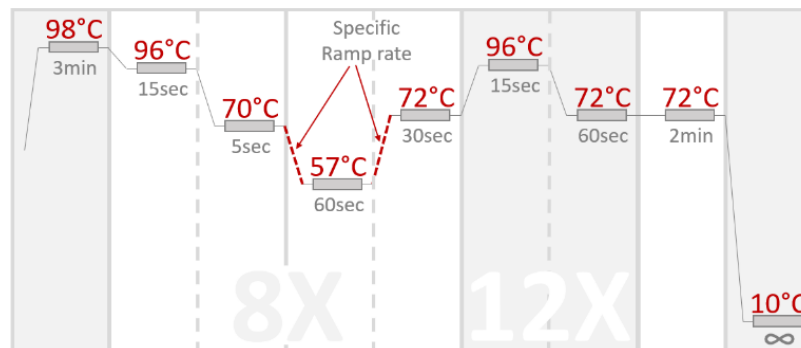


FIGURA 2. VISTA GRÁFICA DEL PCR CYCLING PROTOCOL

Procedimiento

- Encienda el instrumento termociclador para asegurarse de que esté a la temperatura adecuada después de configurar la placa de PCR.

NOTA: Se ha demostrado que los retrasos de ≥ 1 hora para iniciar el protocolo de ciclado térmico de la placa de PCR disminuyen las puntuaciones Q30.

2. Descongele la PCR Mix, el SNP Primer y la Index Plate a temperatura ambiente, agite en vórtice y centrifugue antes de usarlos y manténgalos en hielo. Confirme que la orientación de la Index Plate sea correcta con A1 en la parte superior izquierda. A continuación, perforo la lámina de la combinación de índice deseada con una punta de pipeta.
3. Nota: Asegúrese de utilizar una punta de pipeta diferente para cada pocillo que se vaya a perforar
4. Nota: Al perforar los pocillos, asegúrese de no alterar la solución de índice
5. Coloque una placa de PCR nueva sobre hielo (si usa el TruSeq Index Plate Fixture, manténgala en hielo). Añada 8 μ L de mezclas premezcladas de doble índice i7 e i5 de la placa de 96 índices a la placa de PCR nueva sobre hielo utilizando una pipeta sencilla P10-P20 o una pipeta multicanal P10-P20.
Nota: Los pocillos están precargados con suficiente excedente para permitir el pipeteo a ciegas. Asegúrese de tocar el fondo del pocillo y aspirar todo el volumen. Confírmelo con una comprobación visual.
Nota: Para reducir los riesgos de contaminación por secuenciación de ejecución a ejecución, se recomienda rotar la combinación de cebadores i5 e i7 y los pocillos asignados entre ejecuciones. Asimismo, se recomienda realizar un lavado de secuenciación posterior a la ejecución en el MiSeq con lejía después de cada ejecución (consulte las instrucciones del fabricante).
6. Añada 16 μ L de su ADN preparado a cada pocillo de muestra de placa de PCR.
7. Retire la enzima de PCR de -20°C , muévela y centrifúguela manteniéndola en hielo. Prepare una mezcla maestra en un tubo Eppendorf de 1,5 mL para el número adecuado de muestras «N» utilizando la siguiente tabla:

Reactivo	Volumen, 1 pocillo (μ L)	Volumen para «N» muestras más un 12 % de excedente recomendado (μ L)
AlloSeq HCT PCR Mix	13,0	$(13,0)*1,12*N$
AlloSeq HCT PCR Enzyme	0,8	$(0,8)*1,12*N$
AlloSeq HCT SNP Primer Pool	2,2	$(2,2)*1,12*N$
Volumen total	16,0	$(16)*1,12*N$

TABLA 3. MEZCLA MAESTRA DE AMPLIFICACIÓN MULTIPLEXADA DE UN SOLO PASO

8. Agite en vórtice la mezcla maestra durante 5 segundos para mezclar y centrifugue brevemente.
9. Añada 16 μ L de la mezcla maestra a cada pocillo de muestra que contenga los cebadores de índice y las muestras de ADN. Asegúrese de cambiar las puntas después de pipetear cada pocillo.
10. Aplique la película de sellado de placas de PCR Microseal 'B' e, inmediatamente, agite en vórtice la placa durante 5 segundos para mezclar.
11. Centrifugue inmediatamente la placa a $1000 \times g$ durante 30 segundos.
12. Coloque inmediatamente la placa en el termociclador en un área posterior a la amplificación y ejecute el PCR Cycling Protocol. El PCR Cycling Protocol dura aproximadamente 1 hora.
NOTA: Punto de parada seguro. Puede dejar la placa en el termociclador hasta 48 horas en el paso de espera de 10°C , si es necesario. A continuación, lleve a cabo el procedimiento de limpieza que se indica a continuación.

2.3. Limpieza de la biblioteca y determinación de la concentración

Antes de empezar

1. Confirme el contenido del kit, la temperatura de almacenamiento adecuada y asegúrese de que están disponibles los consumibles y el equipo necesarios.
2. Asegúrese de leer y seguir el manual de instrucciones del fabricante para los instrumentos y métodos recomendados a continuación en este flujo de trabajo:

- a) Imán DynaMag-2
 - b) Qubit dsDNA HS Assay Kit
 - c) Qubit Fluorometer
3. Reactivos necesarios para este paso:
 - a) Placa de PCR del paso anterior
 - b) AlloSeq HCT Purification Beads, caja 3 almacenada entre 2 y 8 °C
 - c) AlloSeq HCT Resuspension Buffer, caja 3 almacenada entre 2 y 8 °C
 - d) Alcohol etílico para biología molecular – no incluido
 - e) Agua de grado PCR – no incluida
4. Retire las Purification Beads del almacenamiento de 2 a 8 °C y equilíbre las a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos.
5. Retire el Resuspension Buffer y la placa de PCR del almacenamiento y manténgalos a temperatura ambiente. Centrifugue la placa de PCR a 1000 x g durante 30 segundos.
6. Prepare una solución nueva de 3 ml de alcohol etílico al 80 % (EtOH), que es suficiente para limpiar un solo conjunto de biblioteca con un 50 % de excedente.

Procedimiento

1. Determine el volumen igual de cada muestra que se agrupará en un solo tubo Eppendorf de 1,5 mL para preparar una biblioteca con un volumen final de 120 µL. Se puede guiar por la Tabla 4.

Número total de muestras en la biblioteca	Volumen por agrupar de cada muestra (µL)
16	7,5
24	5
32	3,75
40	3
48	2,5

TABLA 4. VOLUMEN QUE SE AGRUPARÁ DE CADA MUESTRA PARA PREPARAR LA BIBLIOTECA FINAL DE ALLOSEQ HCT PARA LA LIMPIEZA.

2. Agite en vórtice las AlloSeq HCT Purification Beads hasta que se resuspendan por completo; compruebe visualmente que no quede ningún pellet y mezcle con la pipeta, si es necesario. Centrifugue brevemente para recoger la suspensión de perlas en la parte inferior del tubo. Añada 100 µL de las perlas al tubo de biblioteca de 120 µL.
3. Agite en vórtice el tubo durante 5 segundos a toda velocidad e incúbelo durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugue brevemente, luego coloque el tubo en el imán DynaMag-2 y deje que las perlas se conviertan en pellets durante 5 minutos.
5. Mantenga el tubo en el imán y elimine todo el sobrenadante con una pipeta P200. Si es necesario, utilice una pipeta P20 para eliminar cualquier sobrenadante restante.
6. Añada 65 µL del AlloSeq HCT Resuspension Buffer.
7. Agite en vórtice el tubo durante 5 segundos a toda velocidad e incúbelo durante 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugue brevemente, luego coloque el tubo en el imán y deje que las perlas se conviertan en pellets durante 5 minutos.
9. Mantenga el tubo en el imán y, sin tocar ni alterar las perlas, transfiera 60 µL de sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL.
10. Asegúrese de que las AlloSeq HCT Purification Beads se vuelvan a suspender completamente (consulte el paso 2). Añada 50 µL de las perlas al sobrenadante de biblioteca de 60 µL.

11. Agite en vórtice el tubo durante 5 segundos a toda velocidad e incúbelo durante 5 minutos a temperatura ambiente.
12. Centrifugue brevemente, luego coloque el tubo en el imán y deje que las perlas se conviertan en pellets durante 5 minutos.
13. Mantenga el tubo en el imán y elimine todo el sobrenadante con una pipeta P200.
14. Mantenga el tubo en el imán y añada 1 ml de EtOH recién preparado al 80 % sin alterar las perlas, luego espere 30 segundos.
15. Mantenga el tubo en el imán y, sin tocar ni alterar las perlas, utilice la pipeta P1000 para retirar y desechar el sobrenadante.
16. Repita los pasos 14 y 15 para un segundo lavado con EtOH. Después del segundo lavado, utilice una pipeta P20 para eliminar cualquier resto de EtOH.
17. Mantenga el tubo abierto y seque al aire el pellet de perlas durante 5-10 minutos, o hasta que no quede EtOH.
18. Añada 35 µL del AlloSeq HCT Resuspension Buffer.
19. Agite en vórtice el tubo durante 5 segundos a toda velocidad e incúbelo durante 5 minutos a temperatura ambiente.
20. Centrifugue brevemente, luego coloque el tubo en el imán y deje que las perlas se conviertan en pellets durante 5 minutos.
21. Mantenga el tubo en el imán y, sin tocar ni alterar las perlas, transfiera 32 µL de sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL.
NOTA: Punto de parada seguro. Almacene la biblioteca limpia entre -15 y -25 °C durante un máximo de 7 días.
22. Determine la concentración del conjunto final de la biblioteca utilizando un método fluorométrico; se recomienda el Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (n.º de referencia Q32851 de Thermo Fisher).
NOTA: El método recomendado para la cuantificación tiene un rango de detección entre 10 pg/µL y 100 ng/µL. Esto cubre las concentraciones de la biblioteca AlloSeq HCT que pueden ser tan bajas como 0,1 ng/µL. Si utiliza un método diferente, asegúrese de que pueda proporcionar una cuantificación precisa en el rango adecuado.
23. **Opcional**, Evaluación del control de calidad de la biblioteca en TapeStation:

Tamaño del producto (PS)	Tamaño de producto no específico (NSPS)
250-300 bps	<200 bps

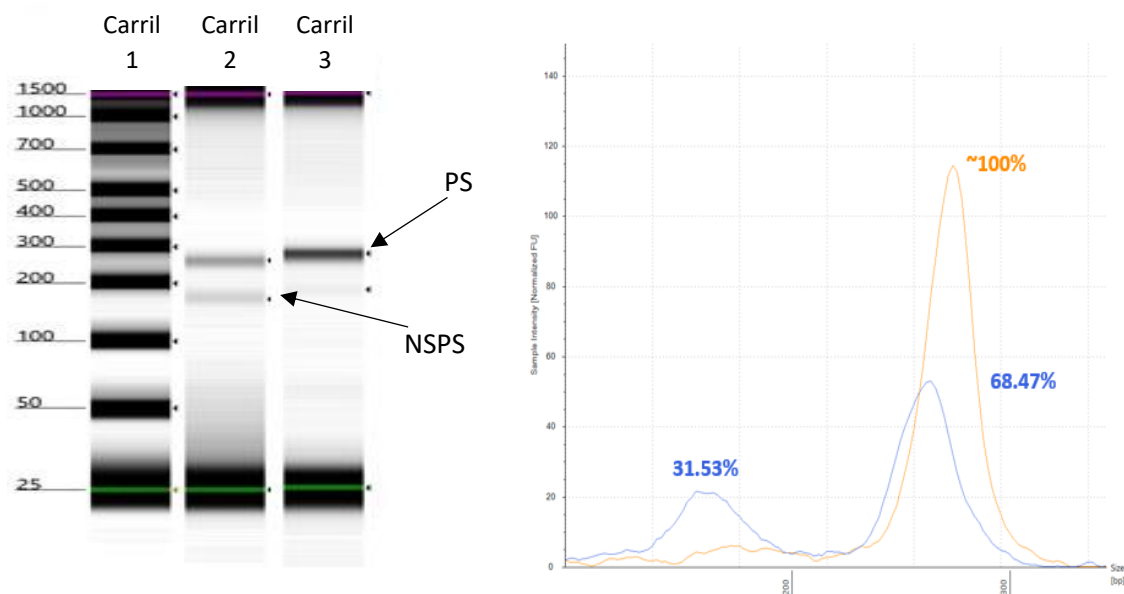


FIGURA 3. PERFILES DE LA TAPESTATION. GEL: CARRIL 1: ESCALA DE TAMAÑOS, CARRIL 2 Y CURVA AZUL: ANTES DEL SEGUNDO LAVADO, CARRIL 3 Y CURVA AMARILLA: DESPUÉS DEL SEGUNDO LAVADO. LA PRESENCIA DE PRODUCTOS NO ESPECÍFICOS NO AFECTARÁ NECESARIAMENTE A LA EJECUCIÓN DE LA SECUENCIACIÓN MIENTRAS HAYA MÁS PRODUCTOS QUE PRODUCTOS NO ESPECÍFICOS.

3. Flujo de trabajo de secuenciación

En esta sección se describen los pasos necesarios para preparar la biblioteca final que se cargará en el instrumento MiSeq. Consulte el manual de instrucciones de Illumina MiSeq para obtener información completa sobre el flujo de trabajo y el funcionamiento del instrumento para iniciar una ejecución de secuenciación.

3.1. Desnaturalización y dilución de bibliotecas para secuenciación

En este paso del flujo de trabajo, el usuario debe decidir si desea incluir el control de secuenciación de Illumina PhiX v3 a una concentración final del 1 % en la biblioteca HCT. Siga el procedimiento adecuado que se indica a continuación (con o sin control PhiX) para preparar la biblioteca que se cargará en el cartucho de reactivos Illumina.

Antes de empezar

1. Asegúrese de leer y seguir el manual de instrucciones del fabricante del instrumento Illumina MiSeq.
2. Reactivos necesarios para este paso:
 - a) Biblioteca de secuenciación final del paso anterior
 - b) AlloSeq HCT 2N NaOH, caja 1 almacenada entre -15 y -25 °C
 - c) Agua de grado PCR – no incluida
 - d) Illumina MiSeq v3 150 Cycle Kit – no incluido
 - e) [Opcional] Control de secuenciación Illumina PhiX v3 – no incluido
3. Descongele 2N NaOH a temperatura ambiente, luego colóquelo en hielo.
 NOTA: La solución de NaOH absorberá fácilmente el CO₂ de la atmósfera, alterando el pH y el rendimiento del reactivo. Asegúrese de que el tubo de 2N NaOH esté sellado mientras no se esté utilizando.
4. Descongele y prepare los reactivos de secuenciación de Illumina de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

5. Genere una hoja de muestra utilizando el software AlloSeq HCT, de acuerdo con las instrucciones contenidas en las IU del software AlloSeq HCT.

Procedimiento (sin control PhiX)

1. Prepare una dilución de la biblioteca final a 1,33 nM en el AlloSeq HCT Resuspension Buffer. Si es necesario, utilice la siguiente ecuación para convertir la concentración de ng/μL a nM:

$$\text{Concentración (nM)} = \frac{\text{Concentración (ng/μL)} * 1,000,000}{120,065}$$

2. Si la concentración del conjunto de biblioteca es <0,16 ng/ul, no añada un tampón de resuspensión adicional.
3. Prepare 0,2N NaOH recién diluido para utilizarlo en la desnaturalización de la biblioteca de 1,33 nM. Combine 4 μL de 2N NaOH con 36 μL de agua de grado PCR y mezcle bien. La solución de 0,2N NaOH debe desecharse dentro de las 12 horas posteriores a la preparación.
4. En un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL, añada 9 μL de biblioteca de 1,33 nM y 3 μL de 0,2N NaOH. Si la concentración del conjunto de biblioteca era de <0,16 ng/ul, realice los ajustes de volumen apropiados para mantener una relación Biblioteca:NaOH de 3:1 para garantizar una desnaturalización adecuada.
5. Agite en vórtice, centrifugue brevemente e incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
6. Añada 588 μL de HT1 refrigerado para llevar la concentración de la biblioteca a 20 pM.
7. Agite en vórtice brevemente y centrifugue. Almacene sobre hielo.
8. Cargue 600 μL de la biblioteca desnaturalizada a 20 pM en el cartucho de secuenciación de Illumina MiSeq previamente descongelado y preparado según las recomendaciones del fabricante.
9. Proceda de acuerdo con el manual de instrucciones de Illumina MiSeq para cargar la celda de flujo, el cartucho de reactivo y el tampón de incorporación en el instrumento para iniciar la ejecución de secuenciación. Asegúrese de usar una hoja de muestra preparada utilizando el software AlloSeq HCT, de acuerdo con las instrucciones contenidas en las IU del software AlloSeq HCT.

Procedimiento (con control PhiX)

1. Prepare una dilución de la biblioteca final a 1,33 nM en el AlloSeq HCT Resuspension Buffer. Si es necesario, utilice la siguiente ecuación para convertir la concentración de ng/μL a nM:

$$\text{Concentración (nM)} = \frac{\text{Concentración (ng/μL)} * 1,000,000}{120,065}$$

2. Si la concentración del conjunto de biblioteca es <0,16 ng/ul, no añada un tampón de resuspensión adicional.
3. Prepare 0,2N NaOH recién diluido para utilizarlo en la desnaturalización de la biblioteca de 1,33 nM. Combine 4 μL de 2N NaOH con 36 μL de agua de grado PCR y mezcle bien. La solución de 0,2N NaOH debe desecharse dentro de las 12 horas posteriores a la preparación.
4. En un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL, añada 9 μL de biblioteca de 1,33 nM y 3 μL de 0,2N NaOH. Si la concentración del conjunto de biblioteca era de <0,16 ng/ul, realice los ajustes de volumen apropiados para mantener una relación Biblioteca:NaOH de 3:1 para garantizar una desnaturalización adecuada.
5. En otro tubo Eppendorf nuevo de 1,5 mL, mezcle 2 μL de 10 nM de PhiX y 2 μL de 0,2N NaOH.
6. Agite en vórtice ambos tubos, centrifugue brevemente e incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
7. Añada 582 μL de HT1 refrigerado al tubo de la biblioteca para llevar la concentración a 20 pM.
8. Añada 996 μL de HT1 refrigerado al tubo PhiX para llevar la concentración a 20 pM.
9. Agite en vórtice brevemente y centrifugue tanto la biblioteca como los tubos PhiX. Almacene sobre hielo.
10. Añada 6 μL de la solución de 20 pM de PhiX al tubo de la biblioteca de 20 pM. Agite en vórtice brevemente y centrifugue. Almacene sobre hielo.

NOTA: La concentración final de PhiX en la biblioteca es de aproximadamente el 1 %.

11. Cargue 600 μL de la biblioteca a 20 pM en el cartucho de secuenciación de Illumina MiSeq previamente descongelado y preparado según las recomendaciones del fabricante.

12. Proceda de acuerdo con el manual de instrucciones de Illumina MiSeq para cargar la celda de flujo, el cartucho de reactivo y el tampón de incorporación en el instrumento para iniciar la ejecución de secuenciación. Utilice una hoja de muestra preparada utilizando el software AlloSeq HCT, de acuerdo con las instrucciones contenidas en las IU del software AlloSeq HCT.

Instrumento	Densidad media del clúster (K/mm2)	Filtro de paso	Lecturas asignadas
MiSeq	800-1800	>85 %	>75 %

Nota de parámetros de secuenciación: Valores típicos observados en el análisis posterior a la ejecución

4. Información adicional

El protocolo descrito en esta guía da por hecho que ha revisado el contenido de este apartado, ha confirmado el contenido del kit, las condiciones de almacenamiento adecuadas y ha obtenido todos los consumibles y equipos necesarios.

4.1. Contenido y requisitos de almacenamiento del AlloSeq HCT Kit

Cuando se almacenan siguiendo las especificaciones de temperatura que se indican a continuación, los componentes del kit se pueden utilizar hasta la fecha de caducidad indicada en los envases exteriores del kit (vida útil de 24 meses). Después de su uso, los kits/componentes deben devolverse inmediatamente a las condiciones de almacenamiento. Estos kits se han sometido a pruebas de estabilidad en uso en las que se ha demostrado que los reactivos congelados pueden tolerar hasta 12 ciclos de congelación y descongelación.

Estos kits NO deben utilizarse más allá de su fecha de caducidad.

Reactivo	Cantidad	Tipo de tubo
AlloSeq HCT PCR Mix	1	2 mL
AlloSeq HCT PCR Enzyme	1	0,5 mL
AlloSeq HCT SNP Primer Pool	1	0,5 mL
2N NaOH AlloSeq HCT	1	0,5 mL

TABLA 5. ALLOSEQ HCT REAGENT, CAJA 1, ALMACENE ENTRE -15 Y -25 °C

Reactivo	Cantidad	Volumen del pocillo	Sello de placa
AlloSeq HCT Index Plate	1	200 µl	Lámina perforable

TABLA 6. ALLOSEQ HCT REAGENT, CAJA 2, ALMACENE ENTRE -15 Y -25 °C

Reactivo	Cantidad	Tipo de tubo
AlloSeq HCT Purification Beads	2	2 mL
AlloSeq HCT Resuspension Buffer	2	2 mL

TABLA 7. ALLOSEQ HCT, CAJA DE REACTIVOS 3, ALMACENE ENTRE 2 Y 8 °C

4.2. Seguridad de AlloSeq HCT

Adopte unas buenas prácticas de laboratorio (seguridad y prevención de la contaminación) cuando realice este procedimiento.

Todos los riesgos se han mitigado hasta un límite aceptable gracias al proceso de gestión de riesgos de CareDx Pty

Ltd. Se deben seguir las instrucciones de uso, incluidos los libros de trabajo proporcionados, para evitar situaciones de uso peligroso.

Consulte la Ficha técnica de seguridad y adopte todas las precauciones necesarias durante la manipulación y eliminación. Para obtener más información sobre todos los materiales peligrosos contenidos en el kit AlloSeq HCT, consulte TEC513_Ficha técnica de seguridad AlloSeq HCT en <http://www.caredx.com>.

COMPONENTE DEL KIT	SÍMBOLOS/ PICTOGRAMAS	ADVERTENCIA DE SEGURIDAD
<u>2N NaOH</u> Contiene hidróxido de sodio		Palabra de advertencia Peligro Indicaciones de peligro H314 - Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. H318 - Provoca lesiones oculares graves. Consejos de prudencia - Reglamento de la UE, EE. UU. y AU P260 - No respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. P264 - Lavarse concienzudamente la cara, las manos y la piel expuesta tras la manipulación. P280 - Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. P301 + P330 + P331 - EN CASO DE INGESTIÓN: enjuagarse la boca. NO provocar el vómito. P303 + P361 + P353 - EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ducharse. P363 - Lavar las prendas contaminadas antes de volver a usarlas. P310 - Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. P304 + P340 - EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. P305 + P351 + P338 - EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. P405 - Guardar bajo llave. P501 - Eliminar el contenido/el recipiente de acuerdo con las normativas locales, regionales, nacionales e internacionales, según corresponda.
<u>AlloSeq HCT Resuspension Buffer</u> Contiene EDTA		Palabra de advertencia Peligro Indicaciones de peligro H319 - Provoca irritación ocular grave. Consejos de prudencia - Reglamento de la UE, EE. UU. y AU P264 - Lavarse la piel concienzudamente tras la manipulación. P280 - Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. P337 + P313 - Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. P305 + P351 + P338 - EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar

COMPONENTE DEL KIT	SÍMBOLOS/ PICTOGRAMAS	ADVERTENCIA DE SEGURIDAD
		las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Llamr inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico.

4.3. Se requieren consumibles y equipos adicionales

Los consumibles y equipos que se enumeran a continuación son necesarios para el flujo de trabajo de preparación de la biblioteca, pero no están incluidos en el AlloSeq HCT Kit.

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

Consumible	Fabricante/Proveedor	Número de catálogo	Cantidad
Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL	Proveedor de laboratorio general	NA	50
Tapones de rosca externa FluidX	Brooks Life Sciences	68-53100-Z6N (naranja) 68-53100-Z1N (blanco)	960 tapones c/u
Puntas de pipeta de barrera de 20 µl, 200 µl y 1000 µl	Rainin o equivalente	Múltiple	2 cajas de 96
Tubos de centrífuga cónicos (15 mL)	Proveedor de laboratorio general	NA	1
Alcohol etílico, 200 grados, para biología molecular	Sigma-Aldrich	E7023-500 mL	1
Placas de PCR de 96 pocillos	Proveedor de laboratorio general	NA	1 placa
Sellos adhesivos Microseal 'B'	Bio-Rad	MSB1001	1 paquete de 96
Agua de grado PCR, 10 mL	Proveedor de laboratorio general	NA	1
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher	Q32851	1
MiSeq Reagent kit v3 (150 ciclos)	Illumina	MS-102-3001	1
[Opcional] PhiX Sequencing Control v3	Illumina	FC-110-3001	1

TABLA 8. CONSUMIBLES NECESARIOS NO INCLUIDOS EN EL ALLOSEQ HCT KIT.

Equipo/Instrumento	Fabricante
Pipetas de 20 µL, 200 µL, 1000 µL	Rainin o equivalente
Pipetas multicanal de 20 µl y 200 µl	Rainin o equivalente
Sistema MiSeq	Illumina
TruSeq Index Plate Fixture Kit (2 accesorios)	Illumina, FC-130-1005
Imán DynaMag-2	Thermo Fisher, n.º de catálogo 12321D
Minicentrífuga	Proveedor de laboratorio general
Centrífuga de microplacas	Proveedor de laboratorio general
Agitadora vortical	Proveedor de laboratorio general
Uno de los siguientes termocicladores de 96 pocillos: - Sistema GeneAmp PCR 9700 - Veriti Thermal Cycler - SimpliAmp Thermal Cycler - Mastercycler® Nexus Gradient (bloque de aluminio)	Applied Biosystems (descatalogado) Thermo Fisher, n.º de catálogo 4375786 Thermo Fisher, n.º de catálogo A24811 Eppendorf, n.º de catálogo 6331000025
Qubit Fluorometer	Thermo Fisher

TABLA 9. EQUIPOS E INSTRUMENTOS RECOMENDADOS PARA LA PREPARACIÓN DE LA BIBLIOTECA DE SECUENCIACIÓN ALLOSEQ HCT.

4.4. Referencias relevantes

La siguiente lista contiene manuales de instrucciones a los que se hace referencia a través del flujo de trabajo de preparación de la biblioteca AlloSeq HCT. Léalos detenidamente antes de iniciar el procedimiento para asegurarse de que el equipo/instrumento se utilizan correctamente. Asegúrese de buscar en internet las versiones actualizadas de los documentos enumerados.

Sistema de PCR GeneAmp 9700, Manual del usuario del módulo base, Thermo Fisher
Guía del usuario del termociclador Veriti de Applied Biosystems, Thermo Fisher
Guía del usuario del termociclador SimpliAmp de Applied Biosystems, Thermo Fisher
Manual de instrucciones de Mastercycler Nexus, Eppendorf
Guía del sistema MiSeq, Illumina
Sistema MiSeq de desnaturalización y dilución de bibliotecas, Illumina

5. Información del contacto

Fabricante legal:

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.: +1-877-653-7871
Fax: +1-610-344-7989
Correo electrónico: orders-us@caredx.com
Sitio web: <http://www.caredx.com>

CH-REP:

Qarad Suisse S.A.,
World Trade Center, Avenue Gratta-Paille 2, 1018 Lausana, Suiza,
CHRN: CHRN-AR-20002058

Soporte técnico y notificación de incidencias graves:

Correo electrónico: techsupport-global@caredx.com

Cualquier incidencia grave que se haya producido en relación con el producto se le deberá notificar al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario o el paciente

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

Productos relacionados:

Software AlloSeq HCT

6. Referencias

1. Blouin AG and Askar M. Chimerism analysis for clinicians: a review of the worldwide practices. *Bone Marrow Transplant* 57: 347-359. 2022.
2. Blouin AG, Ye F, Williams J, Askar M. A practical guide to chimerism analysis: Review of the literature and testing practices worldwide. *Hum Immunol* 82(11): 838-849. 2021.
3. Kitcharoen K, Witt CS, Romphruk AV, Christiansen FT, Leelayuwat C. MICA, MICB, and MHC Beta Block Matching in Bone Marrow Transplantation Outcome. *Hum Immunol* 67: 238-246. 2006.
4. Vynck M, Nollet F, Sibbens L, Lievens B, Denys A, Cauwelier B, Devos H. Performance Assessment of the Devyser High-Throughput Sequencing-Based Assay for Chimerism Monitoring in Patients after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Mol Diagn* 23: 1116-1126. 2021.
5. Saliba RM, Veltri L, Rondon G, Chen J, Al-Atrash G, Alousi A, Martinez C, Augustine L, Hosing CM, Oran B, Rezvani K, Shpall EJ, Kebriaei P, Khouri IF, Popat U, Champlin RE, Ciurea SO. Impact of graft composition on outcomes of haploidentical bone marrow stem cell transplantation. *Haematologica* 106(1): 269-274.

Historial del método

Versión	Fecha	Modificación (IFU100-ES v1.0 es la traducción del texto maestro en inglés IFU100 v6.1)
IFU100 v1.0	1 de abril de 2022	Primera versión de las IU de AlloSeq HCT 96 – IVD CE.
IFU100 v2.0	2 de mayo de 2022	Actualizar detalles de rep EC, actualizar el apartado 1.7 con las técnicas de quimerismo utilizadas. Adición del apartado 6: Referencias.
IFU100 v3.0	11 de mayo de 2022	Se actualizó el apartado 1.1 para reflejar los resultados de los estudios de verificación CE.
IFU100 v4.0	16 de agosto de 2022	Actualizar el apartado 1.5; 230/260 corregido a 260/230 para que el valor de 2 sea correcto. Quitar biotina. En el apartado 3.1 definir el protocolo; con o sin control PhiX. Apartado 2.2, se ha aclarado bloques de aluminio de Eppendorf Nexus (ZD-2233). Apartado 10: Adición de requisitos de informes de vigilancia.
IFU100 v5.0	16 de noviembre de 2022	Se añadieron instrucciones a los pasos 4, 8, 12 y 20 del apartado 2.3 (Procedimiento) para centrifugar brevemente el contenido del tubo antes de colocarlo en el imán. Esto sirve para aclarar que el operario no debe centrifugar el tubo después del agitado en vórtice, que es el procedimiento estándar. Debe incubarse durante 5 minutos, y el centrifugado se realiza inmediatamente antes de colocarlo en el imán. De este modo, las IU se ajustan a IFU100_Libro de trabajo de AlloSeq HCT – IVD CE.
IFU100 v6.0	3 de noviembre de 2023	Incorporación de un representante autorizado suizo.
IFU100 v6.1	1 de marzo de 2024	Corrección de Unidad de Medida por concentración en la Sección 3
IFU100-ES v1.0	1 de marzo de 2024	IFU100 v6.1 traducido al español.