



Software AlloSeq HCT

Instrucciones de uso

IFU108-ES

N.º de versión de software: 2.2.1

N.º de versión del documento: 1.0



ASHCTS2



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.	Visión general.....	2
1.1	Visión general del sistema y del software	2
1.2	Uso previsto	2
1.3	Limitaciones	3
2.	Requisitos informáticos y compatibilidad.....	3
2.1	Archivos de datos compatibles	3
3.	Instrucciones para el usuario experimentado	3
4.	Instrucciones para el usuario novel	4
4.1	Introducción	4
4.2	Receptores y Donantes	4
4.3	Samples (Muestras)	5
4.4	Lotes.....	6
4.5	Análisis de los resultados	7
4.6	Revisión de los resultados.....	7
5.	Solución de problemas.....	10
6.	Información de contacto.....	12

1. Visión general

En estas instrucciones de uso (IU) se describen la funcionalidad y los pasos necesarios para realizar el análisis de datos utilizando el software AlloSeq HCT. El kit de ensayo AlloSeq HCT y el software AlloSeq HCT se denominan de manera colectiva AlloSeq HCT.

Existe una «Guía de instalación» independiente (IFU106) para la familia de productos AlloSeq, que debe leerse antes de estas IU.

1.1 Visión general del sistema y del software

AlloSeq HCT es una solución multiplexada basada en PCR de un solo paso para la preparación de bibliotecas de secuenciación a partir de ADN extraído de muestras biológicas de receptores y donantes de trasplantes de células madre hematopoyéticas. Los datos de secuenciación generados (en archivos FASTQ) se utilizan para calcular el % de ADN del receptor y del(de los) donante(s) presente en la muestra biológica con el fin de determinar el nivel de quimerismo genético del receptor posterior al trasplante en el momento en el que se recogió la muestra. Puede encontrar más información sobre el ensayo AlloSeq HCT en las IU del ensayo AlloSeq HCT.

Los 202 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son:

- (1) están distribuidos en los 22 pares de cromosomas autosómicos del genoma humano;
- (2) son bialélicos, con una frecuencia alélica entre 0,4 y 0,6 en todas las poblaciones;
- (3) están ubicados en regiones genómicas que se pueden secuenciar con un alto nivel de confianza; y
- (4) no están en desequilibrio de ligamiento o asociados a enfermedades.

Los datos de la secuencia se analizan mediante el software AlloSeq HCT, que genera el porcentaje de ADN (% de ADN) de hasta tres genomas distintos (contribuyentes genéticos) detectados en las muestras posteriores al trasplante.

El cálculo del % de ADN del receptor y del(de los) donante(s) presente en las muestras posteriores al trasplante se logra mediante la determinación de la fracción de diferentes nucleótidos secuenciados en la ubicación de cada SNP evaluada. Los genotipos previos al trasplante del receptor y del(de los) donante(s) obtenidos con AlloSeq HCT son necesarios para calcular el % de ADN obtenido de cada contribuyente genético presente en la muestra posterior al trasplante. Se combinan, se alinean y se cuentan las lecturas superpuestas. Los resultados se comparan con los genotipos del receptor y del(de los) donante(s) (SNP/loci informativos). Se recomienda introducir el genotipo de todos los contribuyentes genéticos (receptor y donante(s)) en el análisis de las muestras posteriores al trasplante. Sin embargo, las muestras se siguen pudiendo analizar aunque falte un solo genotipo (ya sea un donante o un receptor).

Una vez que el software analiza los datos, los resultados de todas las muestras se muestran en una ventana de interfaz de usuario, así como en un archivo PDF o en uno compatible con Excel. Los resultados incluyen el % de fracciones de ADN calculado para cada muestra posterior al trasplante, así como los parámetros de Control de Calidad que utiliza el software para aprobar o rechazar una muestra.

1.2 Uso previsto

El uso previsto de los productos AlloSeq HCT (kit de ensayo y software) fabricados por CareDx Pty Ltd es ayudar al usuario a supervisar el injerto después de un trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH).

El kit AlloSeq HCT está diseñado para ser utilizado para medir el % de donante(s) y el % de ADN del receptor presentes en una sola muestra en receptores de TCMH alogénicos.

El software AlloSeq HCT está diseñado para utilizarse con datos generados con el kit AlloSeq HCT.

El software es para uso exclusivo de los profesionales sanitarios que cuenten con la formación adecuada, en laboratorios debidamente acreditados. El producto AlloSeq HCT no debe utilizarse para el diagnóstico de enfermedades ni como única base para la toma de decisiones clínicas.

1.3 Limitaciones

Identidad genética entre donante(s) y receptores

AlloSeq HCT no puede realizar vigilancia en gemelos idénticos.

Genotipos desconocidos

- Donante(s) no emparentado(s): -
 - Se puede realizar una vigilancia cuando se desconoce el genotipo previo al trasplante del receptor o de uno de los donantes. No se puede realizar la vigilancia si hay más de un genotipo desconocido. Algunos de los parámetros de Control de Calidad exigen que todos los genotipos estén presentes y se desactivan si se desconoce uno de los genotipos.
 - En caso de un genotipo desconocido, una recaída de la enfermedad o la pérdida de heterocigosidad pueden influir en los resultados
- Donante(s) emparentado(s): se necesita todo el genotipado previo al trasplante para las pruebas de vigilancia.

Las anomalías conocidas se registran en *TEC935_Software AlloSeq HCT - Anomalías conocidas*.

2. Requisitos informáticos y compatibilidad

Para obtener más información, consulte la Guía de instalación del software IFU106 AlloSeq.

2.1 Archivos de datos compatibles

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

3. Instrucciones para el usuario experimentado

Se recomienda tomar muestras previas al trasplante para AlloSeq HCT, para todas las partes implicadas (Receptor y todos los Donantes). Las muestras previas al trasplante son necesarias para la vigilancia de múltiples donantes, para todas las partes implicadas.

1. Cree Receptores, añada Donantes a Receptores, añada muestras a Receptores y Donantes.
 - a. Marque las muestras de Donante y Receptor previas al trasplante como «genotipos».
2. Cree lotes, añada Muestras al Lote. 'Generate Run Sheet' para el Lote.
3. Realice el protocolo del laboratorio, cargue el secuenciador.
4. Una vez finalizada la secuenciación, 'Analyze Results' para el lote, seleccione la carpeta con los archivos fastq.
5. Muestras previas al trasplante: revise los resultados, establezca 'Approved.'
6. Muestras de vigilancia posteriores al trasplante: revise los resultados, establezca 'Approved' y exporte los resultados.

4. Instrucciones para el usuario novel

4.1 Introducción

En estas IU se ha adoptado la convención de escribir en mayúsculas las «entidades» dentro del software AlloSeq HCT, como Receptor o Muestra, para llamar la atención sobre un elemento que está siendo rastreado por el software.

El software AlloSeq HCT permite el rastreo de múltiples pruebas de vigilancia para el mismo Receptor a lo largo del tiempo. Para ayudar con la validación, también se pueden introducir otros resultados de pruebas de quimerismo en el software.

Se recomiendan muestras previas al trasplante para AlloSeq HCT y son necesarias para las muestras de donantes múltiples. El software AlloSeq HCT puede supervisar a uno, dos o tres* Donantes simultáneamente, siempre que se haya realizado el genotipado previo al trasplante para todas las partes (Receptor y todos los Donantes).

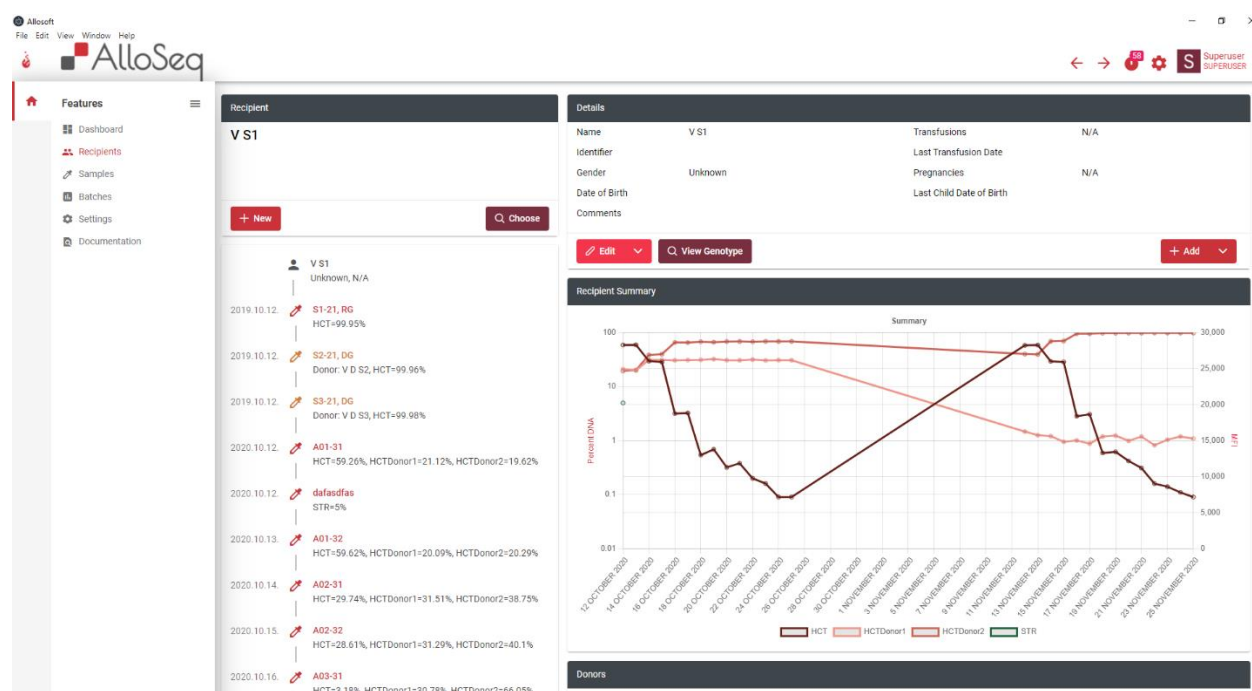
***Nota:** Puede haber algunos casos raros en los que no haya suficiente variabilidad genética entre las partes para rastrear múltiples Donantes emparentados. A los donantes se les asignan ID ("Donante 1", "Donante 2", "Donante 3") en el orden en que se ingresan las muestras en el software AlloSeq HCT.

El software AlloSeq HCT también permite una combinación de Fuente de Muestra y Subpoblación, por lo que las subpoblaciones separadas por células se pueden supervisar por separado a lo largo del tiempo, si es necesario.

4.2 Receptores y Donantes

El punto de partida para el software AlloSeq HCT es crear un Receptor y añadir Donante(s) al Receptor. También se pueden añadir al Receptor los puntos temporales del Trasplante (ya sea recibido o requerido/planificado) y los Tratamientos (intervenciones conocidas que pueden ser útiles para ayudar a interpretar los resultados de las pruebas).

Se puede acceder a la pantalla Receptor desde el menú principal a la izquierda (haciendo clic en la casa y eligiendo 'Recipients') o mediante el botón redondo 'fast start' del Panel de control principal (la pantalla de inicio se ve después de iniciar sesión).



Cuando esté en la pantalla Receptor, puede añadir un nuevo Receptor haciendo clic en el botón 'New'. También puede buscar y elegir un Receptor existente. El software no realiza ninguna comprobación de duplicados de los Receptores, por lo que es más seguro comprobar primero para asegurarse de que el Receptor que desea añadir no se haya añadido ya al software.

La pantalla Receptor contiene un cronograma de todos los eventos que se han registrado para el Receptor y un gráfico que resume todas las mediciones de AlloSeq HCT (y otras pruebas de quimerismo) que se han realizado. En el gráfico no se mostrarán los resultados marcados como «genotipos» (es decir, los resultados previos al trasplante del Receptor y el Donante). Puede añadir 'comments' a cada Receptor, lo que puede ser útil para resumir el estado clínico actual.

Los Donantes se enumeran debajo del gráfico en la pantalla Receptor. Aquí puede añadir nuevos Donantes, editar los detalles del Donante y añadir muestras de genotipado previas al trasplante a los Donantes (usando el botón 'Edit'). Se precisa el Nombre/ID y el Parentesco.

4.3 Samples (Muestras)

Cuando haya creado el Receptor y el(los) Donante(s), la siguiente tarea es añadir Muestras. Esto se puede hacer en la pantalla Muestras (a la que puede acceder a través del menú principal y el botón de inicio rápido) o también se puede acceder desde la pantalla Receptor.

- Si se empieza en la pantalla Receptor, puede usar el botón 'Add' (la lista desplegable contiene 'Sample'), y, para Donantes, puede hacer clic en el donante y usar el botón 'Edit', que tiene la opción 'Add Sample'.
- Si comienza en la pantalla Muestra, puede seleccionar el botón 'New' y decidir añadir una 'Recipient sample', 'Donor Sample' o 'Control Sample'. A continuación, se le pedirá que seleccione un Receptor/Donante. Esta es la única forma de añadir Muestras de Control al software.

The screenshot displays the 'Sample' form in the AlloSeq software. The form is divided into several sections. At the top, there's a 'Sample' header with the identifier 'dadasdfas' and 'Recipient: V S1'. Below this, there are input fields for 'Unique Identifier' (dadasdfas), 'Collection Date' (2020-10-12), 'Source' (false), 'Control' (10), 'Concentration (ng/ul)' (10), 'Genotype' (a checkbox), and 'Comments'. Action buttons include '+ New', 'Choose', 'Edit', 'Add Measurement', 'Set As Genotype', and 'Schedule Test'. The 'Measurements' section features a 'Global Filter' and 'Clear' button, followed by a table with columns 'Name', 'Value', and 'Unit'. It contains one entry: 'STR (%DNA)' with a value of '5' and unit '%DNA'. The 'Batches' section also has a 'Global Filter' and 'Clear' button, followed by a table with columns 'Name' and 'Stage', which currently shows 'No records found'. On the right side, the 'Sample Summary' section includes a graph titled 'Summary' showing '%DNA' on the y-axis (log scale from 0.01 to 100) against time on the x-axis (OCTOBER 2020). A legend indicates that the green line represents 'STR'. The bottom of the interface shows 'AlloSeq from CareDx' and '©All Rights Reserved'.

Cuando añada Muestras, los únicos elementos de datos obligatorios son el identificador de la Muestra (debe ser único en todas las Muestras), la fecha de recogida de la Muestra y la concentración del ADN extraído (actualmente esto solo se mantiene con fines de referencia). En el caso de HCT, también puede añadir una Fuente y una Subpoblación para la muestra. Si está rastreando diferentes Subpoblaciones a partir de una sola muestra de sangre o médula ósea, estas deben introducirse en el software como Muestras separadas. Cada combinación de Fuente (incluida ninguna) y Subpoblación (incluida ninguna) se rastreará por separado, por ejemplo, una Muestra marcada como 'Source: Whole Blood + Subpopulation: CD14', se rastreará por separado de una marcada solo como 'Source: Whole Blood', o una marcada solo como 'Subpopulation: CD14'. Tenga en cuenta que estos metadatos de la Muestra se pueden editar cuando lo desee.

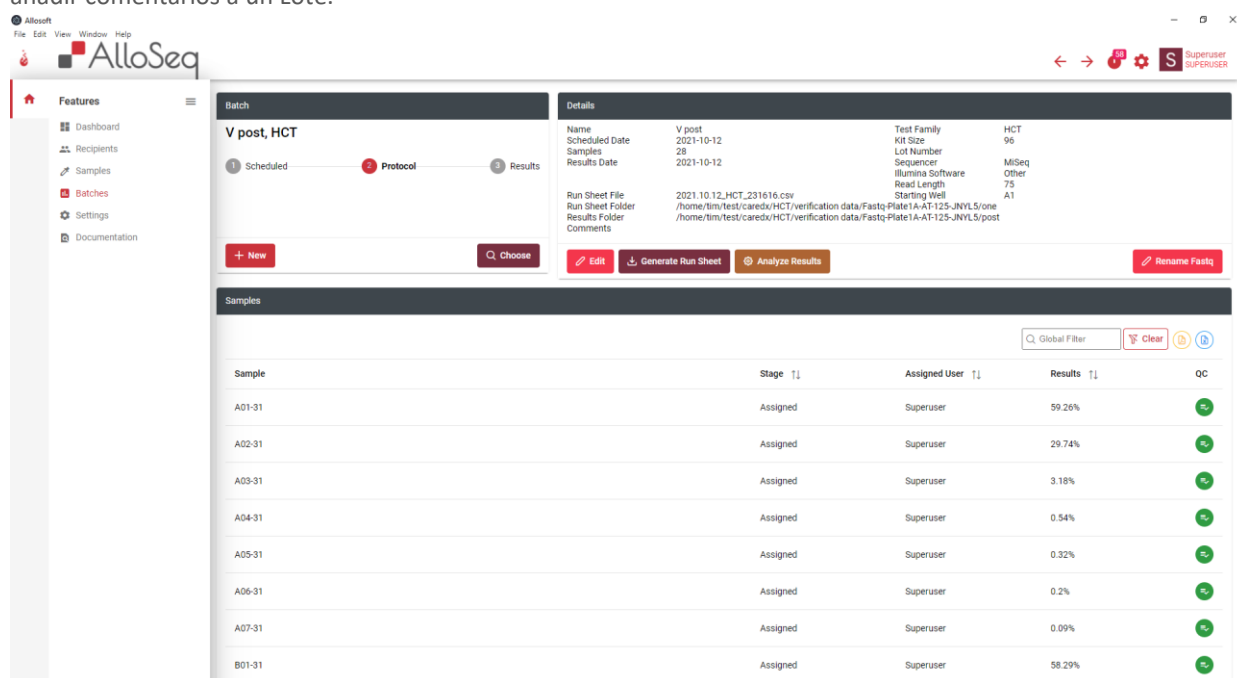
En el caso de las Muestras previas al trasplante que se utilizarán como «genotipo» para el Receptor o el Donante, puede seleccionar la opción de establecerlas como genotipo al crear la muestra o pulsar el botón 'Set Genotype' una vez que haya creado la Muestra. Esto permite que el Resultado se asigne automáticamente como genotipo una vez finalizado el análisis.

En la pantalla Muestra, también se puede añadir cualquier otra Medición que tenga para otros resultados de pruebas que se hayan realizado en la misma muestra/punto temporal. En el caso de AlloSeq HCT, suelen ser los resultados de STR o qPCR de la muestra, que se pueden utilizar para validar los resultados de AlloSeq HCT junto con la técnica existente. Aquí se pueden añadir los resultados de las pruebas de anticuerpos. También puede añadir 'comments' a cada Muestra, si es necesario.

4.4 Lotes

Los Lotes son un grupo de Muestras que se prepararán juntas utilizando los reactivos AlloSeq HCT y se secuenciarán juntas. Puede crear un Lote cuando lo desee para comenzar a planificar las próximas semanas de pruebas. Puede acceder a la pantalla Lote a través del menú principal y el botón de inicio rápido. También puede añadir una Muestra a un lote existente o crear uno nuevo desde la pantalla Muestra.

Utilice el botón 'New' para crear un nuevo Lote. Deberá añadir una fecha y elegir 'HCT' como 'Test Family'. El nombre del Lote es opcional, pero se recomienda darle uno para ayudar a distinguir un Lote de otro. También se pueden añadir comentarios a un Lote.



The screenshot shows the 'Batch' creation screen in the AlloSeq HCT software. The 'Batch' section is titled 'V post, HCT' and shows a progress bar with three steps: 'Scheduled', 'Protocol', and 'Results'. The 'Details' section on the right provides information about the batch, including Name, Scheduled Date, Samples, Results Date, Test Family, Kit Size, Lot Number, Sequencer, Illumina Software, Read Length, Starting Well, Run Sheet File, Run Sheet Folder, Results Folder, and Comments. The 'Samples' table below lists the samples assigned to the batch, including Sample ID, Stage, Assigned User, Results, and QC status.

Sample	Stage	Assigned User	Results	QC
A01-31	Assigned	Superuser	59.26%	Pass
A02-31	Assigned	Superuser	29.74%	Pass
A03-31	Assigned	Superuser	3.18%	Pass
A04-31	Assigned	Superuser	0.54%	Pass
A05-31	Assigned	Superuser	0.32%	Pass
A06-31	Assigned	Superuser	0.2%	Pass
A07-31	Assigned	Superuser	0.09%	Pass
B01-31	Assigned	Superuser	58.29%	Pass

Una vez que se ha creado el Lote, puede 'Add Samples' y decidir qué Muestras de la lista desea probar en el Lote. El orden de las Muestras en el Lote corresponderá al orden de los índices de muestras que se utilizarán de la placa índice del kit de reactivos AlloSeq HCT.

Nota: El orden de las Muestras en el Lote será el orden en que las añada al Lote, la única forma de cambiar el orden es eliminar las Muestras y volverlas a añadir.

Una vez que haya añadido todas sus Muestras al Lote, puede elegir la opción 'Generate Run Sheet', que creará un nuevo archivo de hoja de ejecución con formato CSV que se utilizará en el secuenciador Illumina. También se puede imprimir y llevar al laboratorio para ayudar a hacer coincidir cada Muestra con su índice de la placa de índice.

Nota: Tenga cuidado si abre este archivo en Excel: si guarda los cambios realizados en Excel en el archivo CSV, puede que deje de funcionar para el secuenciador Illumina. Por lo general, es más seguro imprimir este archivo con Excel y realizar cualquier edición (normalmente no es necesario) con un editor de texto como Notepad ++.

Nota: Puede elegir un 'starting well' para la Hoja de Ejecución: si ha optado por dividir un solo kit AlloSeq HCT en varias ejecuciones de secuenciación, así es como puede establecer un pocillo inicial diferente para los índices. Los índices de la Hoja de Ejecución se utilizarán para desmultiplexar los datos de la muestra (es decir, decidir qué datos pertenecen a qué muestra) al final de la secuenciación.

La Hoja de Ejecución se puede volver a generar cuando lo desee: si no ha cambiado nada con el Lote, el contenido será idéntico todas las veces.

Una vez que se ha generado la Hoja de Ejecución, es hora de continuar con el protocolo de laboratorio AlloSeq HCT y preparar las muestras de ADN para la secuenciación.

Función de mapa de placas

Se ha añadido un componente de mapa de placas al software. Este es un uso opcional para el usuario final. Esta función ayuda a organizar la posición del pocillo en el mapa de placas para el archivo de salida (hoja de ejecución).

4.5 Análisis de los resultados

Una vez finalizada la secuenciación, se creará una carpeta en el secuenciador que contiene los archivos fastq. Habrá dos archivos fastq por muestra. Recomendamos copiar/mover la carpeta con los archivos fastq al servidor para el análisis (si se accede a los archivos fastq de forma remota a través de una red, esto puede ralentizar el análisis).

El análisis se realiza yendo a la pantalla Lote, seleccionando el Lote apropiado y usando el botón 'Analyze Results'. Esto le pedirá que indique la ubicación de la carpeta que contiene los archivos fastq. Comprobará la carpeta para asegurarse de que todos los archivos de cada Muestra están presentes y, a continuación, iniciará un análisis. El análisis tarda aproximadamente 30 segundos por muestra. Una vez finalizado, creará una nueva 'Task' para cada resultado: estas Tareas se asignarán a la persona que realizó el análisis. Puede ver sus Tareas en el Panel de control principal cuando inicie sesión. Si es necesario, se pueden reasignar estas Tareas a otros usuarios del software. Estas Tareas permanecerán abiertas hasta que el resultado haya sido 'Approved' por un Director de laboratorio (o Superusuario).

Nota: Los resultados se mostrarán en los gráficos de las pantallas Receptor y Muestra, independientemente del estado de aprobación.

4.6 Revisión de los resultados

Hay un resumen de muy alto nivel de la calidad de cada Resultado visible en el Panel de control y en la pantalla Lote: un botón codificado por colores verde, amarillo o rojo. Si el Resultado contiene una advertencia (amarillo) o un error (rojo), entonces habrá una razón para este fallo de 'Quality Control' (QC) que se muestra en la pestaña Control de Calidad en la pantalla Resultados.

Los resultados se pueden ver (y deben revisarse) individualmente. Sin embargo, suele ser más informativo empezar revisando el Resultado resumido con todos los demás resultados de un Receptor en la pantalla Receptor. Puede acceder a la pantalla Resultado para ver los detalles del Resultado haciendo clic en el identificador de la Muestra en el cronograma de la pantalla Receptor (esto le llevará a la pantalla Muestra, si aún no tiene un Resultado para esta Muestra).

También puede obtener los detalles de cada Resultado desde el Panel de control principal seleccionando el elemento en la lista de Tareas y 'View Results' del menú 'Workflow' o eligiendo 'Results' en el menú 'View'. También puede acceder a los Resultados a través de la pantalla Muestra (haga clic con el botón derecho en la lista 'Tests' y 'View Results').

Cuando esté en la pantalla Resultado, pondrá consultar los detalles del análisis. Se muestra el Resumen del Resultado. La visualización de este variará en función de los metadatos disponibles.

- Si se trata de un resultado de la vigilancia de AlloSeq HCT con genotipos conocidos ya asignados para el Receptor y el(los) Donante(s), el Resultado mostrará los porcentajes exactos detectados para cada parte de la mezcla, por ejemplo, **el 0,5 % del Receptor y el 99,5 % del Donante**.
- Si se trata de un Resultado de genotipado del Receptor previo al trasplante (es decir, la Muestra se establece como un 'genotipo'), el software asignará automáticamente la señal mayoritaria como Receptor.
- Si se trata de un Resultado de genotipado de Donante previo al trasplante (es decir, la Muestra es como un 'genotipo'), el software asignará automáticamente la señal mayoritaria como Donante.

El software asume que el genotipado previo al trasplante se habrá realizado de antemano para los Receptores y Donantes de AlloSeq HCT. Si tiene un solo Lote con una mezcla de Muestras previas y posteriores al trasplante, primero se analizarán las Muestras previas al trasplante (genotipos) y luego las muestras posteriores a él.

El flujo de trabajo de AlloSeq HCT se puede resumir como sigue:

1. Utilice el software para crear muestras de genotipos previos al trasplante para el Receptor y el(los) Donante(es), marque estas muestras como «genotipos»
2. Utilice el ensayo para preparar estas muestras, secuenciarlas y utilizar el software para analizar los resultados
3. Utilice el ensayo y el software para preparar y analizar las Muestras de vigilancia posteriores al trasplante para el Receptor

El Resumen de los resultados muestra qué 'Analysis Type' se utilizó para el análisis. Hay dos Tipos de Análisis:

- **Ciego:** Se realiza automáticamente para todas las muestras (para AlloSeq HCT utilizado principalmente para el genotipado previo al trasplante)
 - Incluye un mecanismo de 'outlier detection' para filtrar automáticamente cualquier resultado estadístico atípico
 - Limitaciones: no pueden indicar quién es quién en la mezcla, no pueden gestionar múltiples donantes y tienen un 'blind spot' en el rango del 30-70 % (por eso se recomienda el genotipado y el posterior análisis Dirigido para AlloSeq HCT)
- **Dirigido:** Se realiza automáticamente si las Muestras (de vigilancia) pertenecen a Receptores con genotipos de Receptor o Donante.
 - Precisa datos de secuenciación profunda
 - No tiene puntos débiles, pero precisa realizar un genotipado previo al trasplante
 - **No** se realizará para Muestras/Resultados que ya estén marcados como genotipos, solo se realizará el análisis Ciego

Se pueden volver a analizar los Resultados, utilizando una vez más el botón 'Analyze Results' de la pantalla Lote. Hay una opción en esta pantalla para 'Perform Only Meta Analysis': esto significa que el análisis básico (y prolongado) de los datos fastq no se volverá a realizar, solo el metaanálisis (Ciego/Dirigido) que sigue al análisis básico. Esto puede ser útil para volver a analizar rápidamente las Muestras de vigilancia en las que los genotipos no se establecieron correctamente de antemano.

Al revisar los resultados, hay algunos elementos que son especialmente importantes:

- El Resultado principal, con desviación estándar en todos los marcadores informativos
- Total de lecturas procesadas: generalmente está limitado por el software a un máximo de 3 millones de lecturas por Muestra. Si es inferior a 300 000 lecturas, activará una advertencia de calidad (que indica una potencial pérdida de sensibilidad por valores muy bajos).
- Cobertura media del marcador: la cantidad media de lecturas de fastq que cubren cada marcador
- Estado del Control de Calidad (QC): dirá 'Passed' si todo es correcto
- Motivo del QC: aparecerá si el estado del QC es 'Warning' o 'Failed'. Los motivos de un problema de QC se pueden ver en la pestaña Control de Calidad.

Se miden varios parámetros de Control de Calidad. Esto variará de una muestra a otra según el tipo de muestra y el tipo de análisis realizado. En la tabla siguiente se resumen estos parámetros de QC.

Nota: Se detectan valores atípicos si la diferencia entre el valor y la media es superior a 5 veces la diferencia estándar. Los marcadores con menos de 50 lecturas o con una tercera señal significativa no superarán las comprobaciones de calidad a nivel de locus.

Nombre	Análisis	Tipo de muestra	Superado	Advertencia	No superado	Descripción
Demasiados valores atípicos	Ciego	Todo	<2	>=2	>10	Los valores atípicos estadísticos en los resultados del marcador se detectan y excluyen automáticamente. Si hay demasiados valores atípicos, esto puede ser indicativo de contaminación/mezcla de la muestra.
Filtros de paso de los marcadores	Ciego	Todo	>=186	<186	<101	El número total de marcadores que superan todos los parámetros de Control de Calidad a nivel de locus. El umbral mínimo es del 92 % (186 marcadores) para que una muestra pase.
Uniformidad	Ciego	Todo	>=151	<151	<81	Para que una muestra pase el filtro de uniformidad, ≥75 % (151) de los 202 marcadores debe tener una cobertura superior al 20 % de la media.
Cobertura media de los marcadores	Ciego	Todo	>=400	<400	<250	El número medio de lecturas que cubren cada marcador. Muy pocas lecturas provocarán una pérdida de sensibilidad (advertencia) o un resultado poco fiable (no superado).
Total de lecturas	Ciego	Todo	>300 000	<=300 000	<=150 000	Número total de lecturas procesadas. Muy pocas lecturas provocarán una pérdida de sensibilidad (advertencia) o un resultado poco fiable (no superado).
Sin marcadores únicos	Dirigidos	+2 genotipos	>1	N/A	0	No se han encontrado marcadores únicos para una o más partes, la vigilancia no es posible.
Heterocigotos insuficientes Marcadores	Dirigidos	+2 genotipos	>5	<=5	N/A	Advertencia si hay muy pocos marcadores heterocigóticos únicos disponibles.
Señal menor inesperada	Dirigidos	+2 genotipos, no faltan genotipos	0	<=2	>2	No debe haber una segunda señal significativa (>0,5 %) en posiciones que sean idénticamente homocigóticas para todas las partes. Detecta contaminación y mezclas de muestras.
Desequilibrio heterocigótico	Dirigidos	+2 genotipos, no faltan genotipos	0	<=2	>2	Las posiciones heterocigóticas idénticas para todas las partes deben ser 50:50 en el resultado. Un número elevado de marcadores desequilibrados (fuera del rango 70:30) es una posible indicación de mezcla o contaminación de la muestra.
Desviación estándar demasiado alta	Dirigidos	No faltan genotipos	<=5	>5	>10	Una desviación estándar alta de los resultados es inesperada y puede ser indicativa de mezcla de la muestra, contaminación o falta de información sobre el genotipo.
Ruido	Metaanálisis	Genotipo	<0,5 %	>=0,5 %	>=25 %	Se espera que los genotipos previos al trasplante sean 100 % Receptor o Donante. Las Muestras mezcladas no serán aptas para su uso como genotipo.
Genotipos insuficientes	Dirigidos	+3 partes	<=1	N/A	>1	A las Muestras con dos o más Donantes solo les puede faltar como máximo un genotipo. Se requiere más información de genotipado para el análisis.

Por defecto, solo se mostrarán los SNP más informativos. Si lo desea, puede elegir otras opciones para filtrar la lista de SNP, incluida la visualización de todos los resultados de SNP.

Un SNP se considerará informativo en uno de estos dos casos:

- Es heterocigótico en una parte e idénticamente homocigótico en todas las demás partes, por ejemplo, AT en el Receptor y AA en todos los Donantes
- Es homocigótico en una parte, y opuestamente homocigótico en todas las demás partes, por ejemplo, TT en un Donante y AA en el Receptor y todos los demás Donantes

La pestaña 'Statistics' proporciona puntos de datos adicionales para aquellas personas que tengan un interés más profundo en la bioinformática subyacente.

Cuando esté satisfecho(a) con los Resultados, puede enviarlos para su Aprobación al Director del laboratorio para que 'Approve and Export' los Resultados. Los Resultados se pueden exportar en formatos CSV, TSV o PDF. Se pueden exportar múltiples Resultados juntos desde el Panel de control principal o desde la Lista de tareas.

5. Solución de problemas

Si todos los parámetros de QC están en verde/aprobados, no debería haber necesidad de solucionar ningún problema en los resultados.

Los parámetros de QC amarillos/con advertencia son indicativos de que hay algo en el Resultado que precisa una inspección manual. En este caso, los Resultados no se verán afectados y podrán ser incluidos en el informe. Los parámetros de QC con advertencia también pueden proporcionar información general si otros parámetros de QC han fallado.

Los parámetros de QC en rojo/con fallo indican que el resultado es dudoso. En algunos casos, es posible que aún se pueda aceptar y crear un informe de los resultados con fallos de QC, consulte a continuación para ver ejemplos.

Se precisa secuenciación profunda para obtener la máxima sensibilidad

AlloSeq HCT no puede proporcionar los máximos niveles de sensibilidad si no se han creado datos de secuenciación suficientes mediante la preparación y secuenciación de una muestra. La muestra se marcará con un error de QC debido a los parámetros de QC para la cobertura media de los marcadores o el total de lecturas en este caso. Sin embargo, si el resultado es superior al 1 %, cualquier pérdida de sensibilidad no tendrá un impacto importante y es probable que el resultado aún se pueda incluir en un informe (a menos que otros parámetros de QC también hayan fallado). Si el resultado es inferior al 1 %, se recomienda repetir la muestra (repita la preparación de la muestra a partir del principio del protocolo de ensayo).

Genotipos ruidosos

Una muestra de genotipo previo al trasplante puede fallar en el parámetro de QC de ruido, lo que indica que la muestra no es 100 % Receptor o Donante como se esperaba. Esta muestra aún se puede utilizar como genotipo en este caso, ya que el software tiene cierta tolerancia integrada para esto. Se recomienda comprobar el genotipo utilizando la función 'View Genotype' en la pantalla Receptor antes de utilizar esta Muestra como genotipo para Muestras de vigilancia posteriores.

Lote ruidoso

Si varias Muestras de genotipo en un Lote fallan con el parámetro de Control de Calidad de ruido o varias Muestras de vigilancia fallan con el parámetro de Control de Calidad de 'Unexpected Minor Signal', es probable que esto se deba a la contaminación del índice causada por el uso de los mismos índices de muestra que la ejecución de la secuenciación anterior o la falta de limpieza del secuenciador entre ejecuciones utilizando las directrices de las IU del ensayo. Si se da este caso, los genotipos seguirán siendo utilizables y es probable que se puedan notificar Muestras de vigilancia con resultados más altos (>10 %). Sin embargo, niveles bajos de contaminación como este requerirán que se repitan las Muestras de vigilancia con resultados bajos.

Contaminación de la muestra

El parámetro de QC de señal menor inesperada puede detectar contaminación superior al 0,5 % en una muestra. Este parámetro de QC solo está disponible si se conocen todos los genotipos previos al trasplante. Si el resultado es bajo y este parámetro de QC ha fallado, se debe repetir la muestra.

Mezcla de muestras

Si el parámetro de QC de señal menor inesperada falla junto con el desequilibrio heterocigótico o la desviación estándar demasiado alta, es probable que esta no sea la muestra correcta para el Receptor, por lo que ha habido una mezcla con las muestras. Se debe prestar atención a otras muestras del mismo Lote, ya que se podrían haber intercambiado dos muestras por accidente. Se puede solucionar esta mezcla sin repetir las muestras. Sin embargo, recomendamos ponerse en contacto con el Soporte técnico de CareDx y solicitar su ayuda.

Failed

Name	Status	Algorithm	Sample Type	Value Detected	Pass Threshold	Warn Threshold	Fail Threshold	Description
Unexpected Minor Signal		Targeted	2+ Genotypes	55	0	<=2	>2	There should be no significant (>0.5%) second signal in positions that are identically homozygous for all parties. Detects contamination and sample mix ups.
Heterozygous Imbalance		Targeted	2+ Genotypes	37	0	<=2	>2	Identically heterozygous positions for all parties should be 50:50 in the result. High numbers of imbalanced markers (outside 70:30 range) is a possible indication of sample mix up or contamination.
Standard Deviation Too High		Targeted	All	30.08	<=5	>5	>10	A high standard deviation in the results is unexpected and may be an indication of sample mix up, contamination or missing genotype information.

6. 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.: +61-8-9336-4212e
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>

Soporte técnico y notificación de incidencias graves:

Correo electrónico: techsupport-labproducts@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:

AlloSeq HCT

Historial del método

Versión	Fecha	Modificación (IFU108-ES v1.0 es la traducción del texto maestro en inglés IFU108_AlloSeq HCT Software v2 IFU CE IVD v7.0)
IFU108 v1.0	31 de marzo de 2022	Primera versión de las IU CE para el software AlloSeq HCT.
IFU108 v2.0	2 de mayo de 2022	Añadir detalles del importador (símbolo). Trasladar las limitaciones al apartado 1.2. Añadir el apartado 2. Eliminar el parámetro de QC en caso de marcadores homocigóticos insuficientes. Añadir el apartado 5, Solución de problemas.
IFU108 v2.1	11 de mayo de 2022	Se ha actualizado para corregir el código postal de Qarad.
IFU108 v3.0	30 de agosto de 2022	Versión 2.1.1, se eliminó la restricción en el análisis de progenitor doble y se ajustaron los umbrales para 3 parámetros de QC Apartado 10: Adición de requisitos de informes de vigilancia.
IFU108 v4.0	25 de julio de 2023	Se ha actualizado 1.2 Limitaciones: genotipos necesarios para las Muestras de vigilancia con Donantes emparentados. Se ha actualizado 4.1 Receptor y Donantes - Para los detalles del Donante, se requiere parentesco si falta algún genotipo. Se ha añadido la función opcional de Mapa de placas en el apartado 4.4 «Lotes» como uso opcional de la función
IFU108 v5.0	24 de octubre de 2023	Adición de detalles de CH-REP.
IFU108 v6.0	11 de enero de 2024	Se ha actualizado 1.3 Limitaciones - En caso de un genotipo desconocido, una recaída de la enfermedad o la pérdida de heterocigosidad pueden influir en los resultados.
IFU108 v7.0	09 de febrero de 2024	Se agregó una aclaración sobre las identificaciones de las muestras de los donantes.
IFU108-ES v1.0	18 de marzo de 2024	La primera traducción al español.