



Instrucciones de uso

IFU095

Número de versión: 6.0

Fecha de edición: Julio de 2022

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 Pty Ltd

Índice

1.	Descripción general	3
1.1	Principio	3
1.2	Uso previsto	4
1.3	Contenido genético dirigido de AlloSeq Tx	4
1.4	Contenido del kit AlloSeq Tx y requisitos de almacenamiento	5
1.5	Limitaciones y contraindicaciones	6
1.6	Requisitos de la muestra	6
1.7	Sustancias interferentes.....	6
1.8	Características de rendimiento	8
1.9	Precisión.....	8
1.10	Especificidad.....	9
1.11	Reproducibilidad y repetibilidad	10
1.12	Límite de detección	10
1.13	Supuestos.....	10
1.14	Seguridad	10
2.	Preparación de la librería (flujo de trabajo Early Pooling)	14
2.0	Introducción al protocolo.....	14
2.1	Preparación de la muestra	14
2.2	Preparación de la librería	14
2.3	Selección de tamaño y purificación.....	17
2.4	Cuantificación Qubit (opcional).....	19
2.5	Visualización en TapeStation (opcional).....	20
3.	Captura híbrida (flujo de trabajo Early Pooling)	21
3.0	Introducción al protocolo.....	21
3.1	Hibridación de sondas	21
3.2	Captura	23
3.3	PCR posterior al enriquecimiento	24
3.4	Purificación de PCR posterior al enriquecimiento.....	25
3.5	Cuantificación Qubit.....	26
3.6	Visualización en TapeStation (opcional).....	26
4.	Preparación de la librería(flujo de trabajo Original)	27
4.0	Introducción al protocolo.....	27
4.1	Preparación de la muestra	28
4.2	Preparación de la librería	28
4.3	Selección de tamaño y purificación.....	32
4.4	Cuantificación Qubit (opcional).....	33
4.5	Visualización en TapeStation (opcional).....	34
5.	Captura híbrida (flujo de trabajo Original).....	35
5.0	Introducción al protocolo.....	35
5.1	Agrupación de muestras	35
5.2	Concentración de pools de librerías (opcional).....	35
5.3	Hibridación de sondas	36
5.4	Captura	38
5.5	PCR posterior al enriquecimiento	39
5.6	Purificación de PCR posterior al enriquecimiento.....	40
5.7	Cuantificación Qubit.....	41
5.8	Visualización en TapeStation (opcional).....	42
6.	Secuenciación	44
6.0	Introducción al protocolo.....	44

6.1 Preparación de PhiX	44
6.2 Dilución y desnaturalización para MiSeq	46
6.3 Dilución y desnaturalización para MiniSeq	47
6.4 Dilución para iSeq.....	48
7. Análisis de secuencias	48
8. Guía de solución de problemas.....	49
9. Información complementaria	50
Licencia	50
Insumos y equipo necesarios pero no suministrados	50
10. Información de contacto	52
11. Referencias	53

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.

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.

La secuenciación se realiza en un secuenciador de Illumina (MiSeq, MiniSeq o iSeq), y los datos de secuencia resultantes se emiten en archivos fastq que se importan al software AlloSeq Assign® para ayudar con el genotipado.

En este documento de *Instrucciones de uso* se describe el procedimiento de uso de la familia de productos CareDx AlloSeq Tx. El contenido genético al que se dirige cada producto AlloSeq Tx específico se enumera en la tabla *Contenido genético dirigido* que aparece a continuación.

Para ayudar con el procesamiento de muestras de laboratorio y el mantenimiento de registros, también se proporcionan cuadernos de trabajo Excel (workbooks) de cada proceso. Los cuadernos de trabajo ayudan con los cálculos de volúmenes de reactivo y la creación de hojas de muestras para la secuenciación. Los cuadernos de trabajo de apoyo incluyen:

IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD

IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD

IFU095-3_AlloSeq Tx Sequencing Workbook CE IVD

IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD

En este documento se describen dos opciones de flujo de trabajo: el flujo de trabajo Original y el flujo de trabajo Early Pooling. El flujo de trabajo Early Pooling agrupa las muestras en un tubo inmediatamente tras la indexación para la realización de los pasos posteriores. El flujo de trabajo Early Pooling elimina la selección de tamaño y la purificación basada en placas, así como el paso opcional de concentración cuando se procesan > 12 muestras/carrera. 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. Junto con el flujo de trabajo Early Pooling debe usarse *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD*.

El formato basado en placas del flujo de trabajo Original es adecuado para laboratorios que optan por la automatización de este procedimiento. Deben utilizarse *IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD*, *IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD* y *IFU095-3_AlloSeq Tx Sequencing Workbook CE IVD* junto con el flujo de trabajo Original.

El kit está diseñado para ser utilizado por personal capacitado en laboratorios regulados. Debe ponerse el debido cuidado y atención durante la manipulación de los productos. 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 diana, 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 el 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.

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 diana	Tamaño del kit	Capacidad de secuenciación
AlloSeq Tx 17	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 Flowcell ≤6 muestras en MiSeq Nano Flowcell ≤24 muestras en iSeq ≤24 muestras en MiniSeq MidOutput Flowcell
AlloSeq Tx 17	ASTX17.1(24)-B-IVD			
AlloSeq Tx 17	ASTX17.1(96)-A-IVD	HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -H, -DRB1/3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1, MICA y MICB	96 preparaciones de librería 8 enriquecimientos (entre 12 y 96 muestras por enriquecimiento)	≤96 muestras en MiSeq v2 Standard Flowcell ≤24 muestras en MiSeq Micro Flowcell ≤6 muestras en MiSeq Nano Flowcell ≤48 muestras en iSeq ≤24 muestras en MiniSeq MidOutput Flowcell
AlloSeq Tx 17	ASTX17.1(96)-B-IVD			
AlloSeq Tx 9	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 Flowcell ≤24 muestras en MiSeq Micro Flowcell ≤6 muestras en MiSeq Nano Flowcell ≤48 muestras en iSeq ≤24 muestras en MiniSeq MidOutput Flowcell
AlloSeq Tx 9	ASTX9.1(96)-B-IVD			

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.

Se están realizando estudios de estabilidad acelerada para extenderse más allá de este marco temporal. Aunque se están realizando pruebas de confirmación en tiempo real, se recomienda encarecidamente NO utilizar estos kits más allá de su fecha de vencimiento.

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
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)
Beads de purificación	1	5mL	N/D	N/D
Beads-1 de purificación	N/D	N/D	3	5mL
Beads-2 de purificación	N/D	N/D	1	0.5mL
Tampón de resuspensión	2	1.5mL	2	5mL
Beads de captura	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/no template control (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

ADN genómico humano de alto peso molecular (suspendido en tampón Tris/EDTA y OD_{260/280} > 1,8) extraído de muestras de sangre completa anticoaguladas con ACD o EDTA. NO utilice muestras de sangre entera que contengan heparina. Este método también puede utilizarse con el ADN de hisopo bucal.

Importante: Todas las referencias al ADN de hisopo bucal dentro de este documento están pensadas únicamente para su uso en investigación. **El ADN de hisopo bucal no ha sido validado con este método para su uso diagnóstico.**

1.7 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 <1 mM EDTA. Use kits comerciales de preparación de ADN sanguíneo y/o evite los tubos de extracción de sangre EDTA

Inhibidor	Fuente potencial	Riesgo	Comentarios
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 AlloSeq Tx, lo que implica que la inhibición debida al arrastre de etanol sea un riesgo bajo, pero ligeramente más alto que otros factores.
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; MgCL2; 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	Proteinasa 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	Mg2+ 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

Inhibidor	Fuente potencial	Riesgo	Comentarios
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
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.

En los estudios de verificación y validación, se utilizó el producto AlloSeq Tx junto con AlloSeq Assign para evaluar la concordancia de genotipos con muestras tipificadas con un método alternativo. Las muestras de control interno se mecanografiaron mediante tipaje basado en secuencias (SBT). Se utilizaron muestras de los repositorios reconocidos internacionalmente de IHW y UCLA como parte de los estudios de verificación, y se tipificaron utilizando varios métodos, entre ellos SBT, SSP y SSO. Se trata de muestras de ADN caracterizadas que representan los alelos HLA más prevalentes y alelos raros seleccionados.

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	Sitios de prueba beta	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

La especificidad en el contexto de los ensayos AlloSeq Tx describe el porcentaje de lecturas de secuencia (que representan fragmentos de ADN capturados por el ensayo) que se asignan a loci distintos del locus objetivo. Todos los ensayos de tipaje HLA que se basan en alguna forma de hibridación entre el ADN genómico y los reactivos de secuencia de oligonucleótidos, independientemente de si son PCR o ensayos de captura híbrida, tendrán un elemento de "falta" de especificidad. Esto es el resultado de que muchos genes del genoma humano forman parte de familias multigénicas. Los genes HLA no son diferentes. HLA-A, -B y -C forman parte de la familia de genes HLA clase 1. Sin embargo, además de los genes bien conocidos, hay pseudogenes HLA y fragmentos de genes y posibles genes funcionales no descritos que pueden ser capturados por las características de especificidad inherentes a los ensayos de captura híbrida. No se conoce el número completo de estos genes, pero sí que varía entre los genomas de diferentes individuos.

Para AlloSeq Tx, la especificidad se captura mediante "lecturas fuera de target". El fin del ensayo AlloSeq Tx es lograr un nivel de especificidad en el que:

1. Las lecturas no específicas NO den como resultado lecturas objetivo que son demasiado bajas en número para realizar un genotipado preciso,
2. Las lecturas no específicas NO contribuyan a la secuencia de consenso de los loci objetivo,
3. Una alta especificidad compromete la sensibilidad y no se capturan algunas regiones de algunos alelos.

AlloSeq Assign es capaz de identificar lecturas no específicas o fuera de target y representarlas en relación con el número total de lecturas capturadas. Estos datos se utilizan como una métrica de control de calidad para el rendimiento del ensayo. Una especificidad demasiado alta o demasiado baja puede indicar temperaturas, tiempos de hibridación incorrectos, problemas de calidad del reactivo y de la sonda.

Los datos de verificación 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 Límite de detección

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.

1.13 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

1.14 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, incluidos los cuadernos de trabajo proporcionados, para 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	SÍMBOLO/PICTOGRAMAS	ADVERTENCIA DE SEGURIDAD
TAMPÓN DE TAGMENTACIÓN Contiene N,N-dimetilformamida		Palabra de señal: Peligro Declaraciones de peligro: H319 - Causa irritación ocular grave H332 - Nocivo por inhalación H350 - Puede causar cáncer H360 - Puede dañar la fertilidad o al feto 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

COMPONENTE DEL KIT	SÍMBOLO/PICTOGRAMAS	ADVERTENCIA DE SEGURIDAD
		<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>P304 + P340 - EN CASO DE INHALACIÓN: Sacar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición cómoda para respirar</p> <p>P313 - Solicitar asistencia/atención médica</p> <p>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</p> <p>P337 + P313 - SI PERSISTE LA IRRITACIÓN OCULAR: 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>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</p>

COMPONENTE DEL KIT	SÍMBOLO/PICTOGRAMAS	ADVERTENCIA DE SEGURIDAD
		<p>P363 - Lavar la ropa contaminada antes de volver a usarla</p> <p>P310 - Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico</p> <p>P304 + P340 - EN CASO DE INHALACIÓN: Sacar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición cómoda para respirar</p> <p>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</p> <p>P405 - Almacenar bajo llave</p> <p>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 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 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</p>

COMPONENTE DEL KIT	SÍMBOLO/PICTOGRAMAS	ADVERTENCIA DE SEGURIDAD
		P501 - Eliminar el contenido/recipiente en una planta de eliminación de residuos aprobada
<p><u>TAMPÓN DE PARADA</u> Contiene dodecil sulfato de sodio</p>		<p>Palabra de señal Advertencia</p> <p><u>Declaraciones de peligro</u> H319 - Causa irritación ocular grave</p> <p><u>Declaraciones de precaución - UE (§28, 1272/2008)</u> 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 1999/45EC 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 <http://www.caredx.com>.

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:

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.

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por muestra (µL)	Preparación necesaria
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.
Mezcla de PCR (o Mezcla-1 de PCR si se utilizan 96 kits)	-15 °C a -25 °C CAJA 4 (o Caja 1 para Mezcla-1 de PCR)	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 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 pocillo 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 la mezcla y los índices de PCR 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),

30. (T) Agite y haga un pulso de 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.

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.

3. 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.
4. 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".

5. Agite y realice un pulso de centrifugación de todos los reactivos antes de usarlos.
6. 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.

7. Distribuya el volumen adecuado (ver la tabla de cálculos anterior o el cuaderno de trabajo) de Beads de purificación diluidas en el tubo de 1,5 mL.
8. Pipetee la mezcla de 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 el volumen adecuado de cada mezcla (ver la tabla de cálculos anterior o el cuaderno de trabajo) al tubo que contiene Beads de purificación 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 Beads de purificación (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 tampón de resuspensión 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.
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. Suministrada 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.
- Alícuote **190 µL** de solución de trabajo en cada uno de los tubos estándar.
- Alícuote **198 µL** de solución de trabajo en cada uno de los tubos pool.
- Alícuote **10 µL** de solución estándar en cada uno de los tubos estándar respectivos.
- Alícuote **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 muestra 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 de muestra 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 el cuaderno de trabajo.

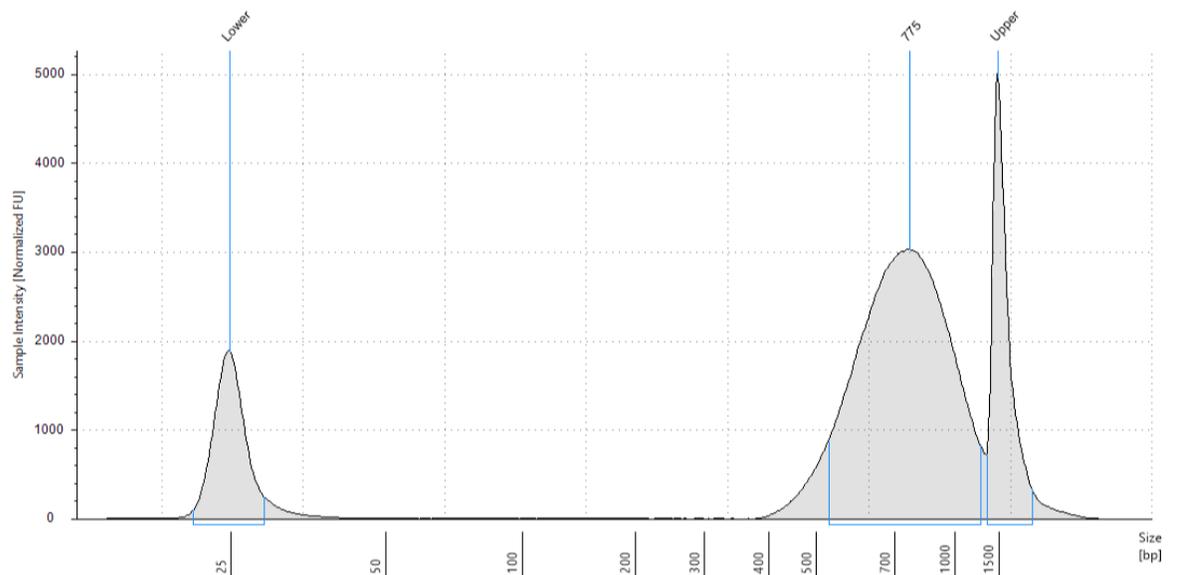


Figura 2.5.1: Imagen representativa de la traza de TapeStation para librerías.

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.

- Agite y realice un pulso de centrifuga de todos los reactivos antes de usarlos.
- 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).

- 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

- 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.
- Si la solución permanece turbia, mezcle 6-8 veces más, coloque la tapa y realice un pulso de centrifuga.
- 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. 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

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
Beads de captura	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.

2. 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.

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

NOTA: Este proceso tarda aproximadamente 1 hora.

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

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 centrífuga 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 mezcla de PCR al tubo.
- 6. Pipetee 10 veces.
- 7. Haga un pulso de centrífuga 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
Beads de purificación (Beads de purificación-2 para kits de 96)	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 diana.
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. Alícuote **190 µL** de solución de trabajo en cada uno de los tubos estándar.
7. Alícuote **198 µL** de solución de trabajo en cada uno de los tubos pool.
8. Alícuote **10 µL** de solución estándar en cada uno de los tubos estándar respectivos.
9. Alícuote **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.

- Reúna la ScreenTape D1000 necesaria, así como las tiras y las tapas de los tubos ópticos TapeStation.
- Transfiera 1 µl de cada pool enriquecido 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 pool y tubo de referencia.
- Selle todos los tubos con las tapas.
- Agite todos los tubos a fondo usando un vórtice de placa IKA a 2000 r/min 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.
- 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).
- Una vez finalizada la carrera, inicie TapeStation Analysis Software para ver los resultados (consulte el manual de usuario de TapeStation para obtener más información).
- Registre los resultados en la tabla del cuaderno de trabajo.

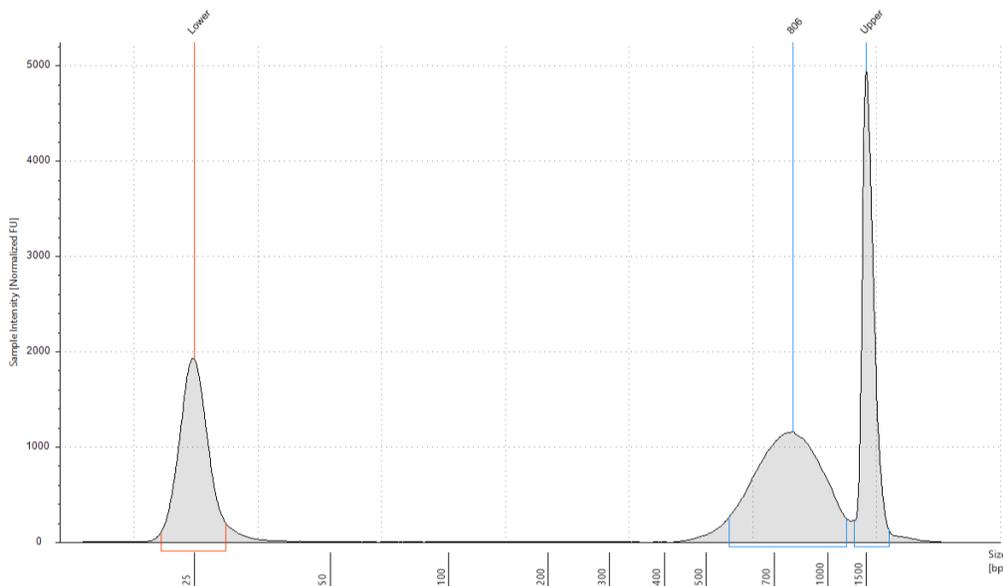


Figura 3.6.1: Imagen representativa de la traza de TapeStation para un pool de librerías enriquecidas.

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, 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 i5 puede modificarse. Seleccione el índice i5 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.

Reactivo	Condiciones de almacenamiento	Volumen por muestra (µL)	Preparación necesaria
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.
Mezcla de PCR (o Mezcla-1 de PCR si se utilizan kits de 96 muestras)	-15 °C a -25 °C CAJA 4 (o CAJA 1 si se utilizan kits de 96 muestras)	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.

2. Agite y realice un pulso de centrifuga de todos los reactivos antes de usarlos.
3. 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).

4. 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.
5. 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.
6. Mezcle la mezcla maestra anterior con un agitador vortex y, a continuación, realice un pulso de centrifuga.
7. Pipetee 40 µL de la mezcla maestra de tagmentación en cada pocillo que contenga una muestra de ADN.
8. Selle la placa con film Microseal B.
9. 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 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 pocillo 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 Tampón de parada 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 la mezcla y los índices de PCR 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 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 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),

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:

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 centrifugación 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. Alícuote 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 beads de purificación 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.
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. Alícuote **190 µL** de solución de trabajo en cada uno de los tubos estándar.
7. Alícuote **198 µl** de solución de trabajo en cada uno de los tubos de muestra.
8. Alícuote **10 µl** de solución estándar en cada uno de los tubos estándar respectivos.
9. Alícuote **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 muestra 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 muestra y pocillo de referencia.
6. Selle la placa con film de aluminio.
7. Agite con un vórtice de placa IKA a 2000 r/min 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.

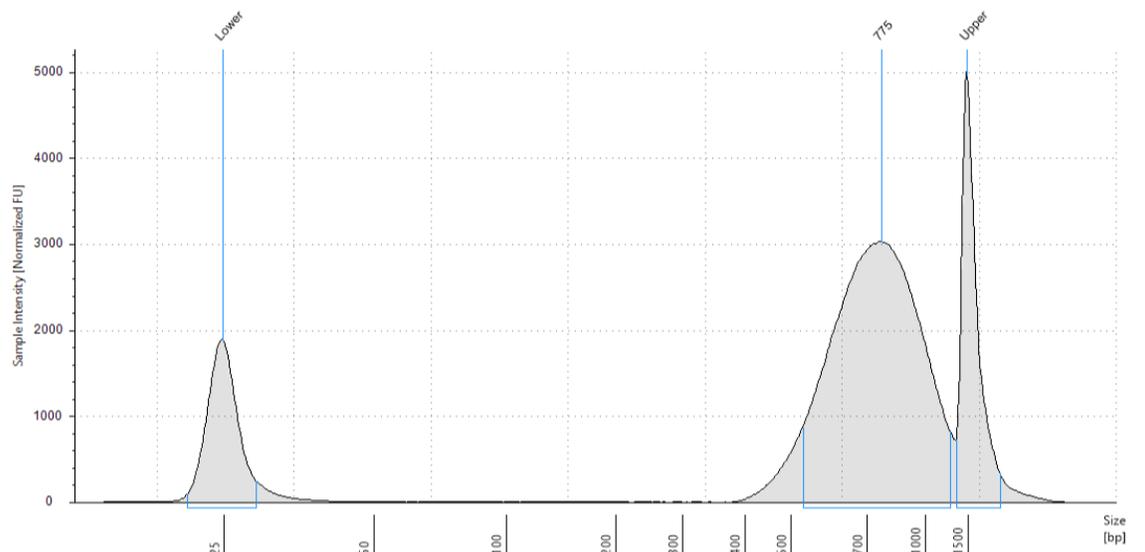


Figura 4.5.1: Imagen representativa de la traza de TapeStation para librerías.

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 *IFU095-2_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, 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, incluidas las de preparaciones de ADN de células bucales, 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 (bucal) 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
Beads de purificación (Beads de purificación-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 1.920 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 Beads de purificación 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 librerías.
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.

- 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 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).

- 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

- Con una pipeta ajustada a 70 µL, mezcle cada pocillo de reacción de hibridación 10 veces, selle y realice un pulso de impulsos.
- Si la solución permanece turbia, mezcle 6-8 veces más con la pipeta.
- 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

- 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.

5.4 Captura

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
Beads de captura	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	Pre caliente 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.

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 microcentrifuga 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 Beads de captura.
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. Pipetee 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.
Mezcla de PCR Mix (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 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 mezcla de PCR al tubo.
6. Pipetee 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
Beads de purificación (Beads de purificación-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 centrifugación 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, 3 veces.
8. Haga un pulso de centrifugación 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 %:
- Añada 200 µL de etanol al 80 % a cada tubo,
 - Incube a temperatura ambiente durante 30 segundos,
 - 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 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Suministrado por el usuario	199	No necesita preparación.
Tinte Qubit BR	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Suministrado por el usuario	1	No necesita preparación.
Estándar BR n.º 1	$2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Suministrado por el usuario	10	Póngalo a temperatura ambiente.
Estándar BR n.º 2	$2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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. Alícuote **190 μL** de solución de trabajo en cada uno de los tubos estándar.
7. Alícuote **198 μL** de solución de trabajo en cada uno de los tubos pool.
8. Alícuote **10 μL** de solución estándar en cada uno de los tubos estándar respectivos.
9. Alícuote **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.

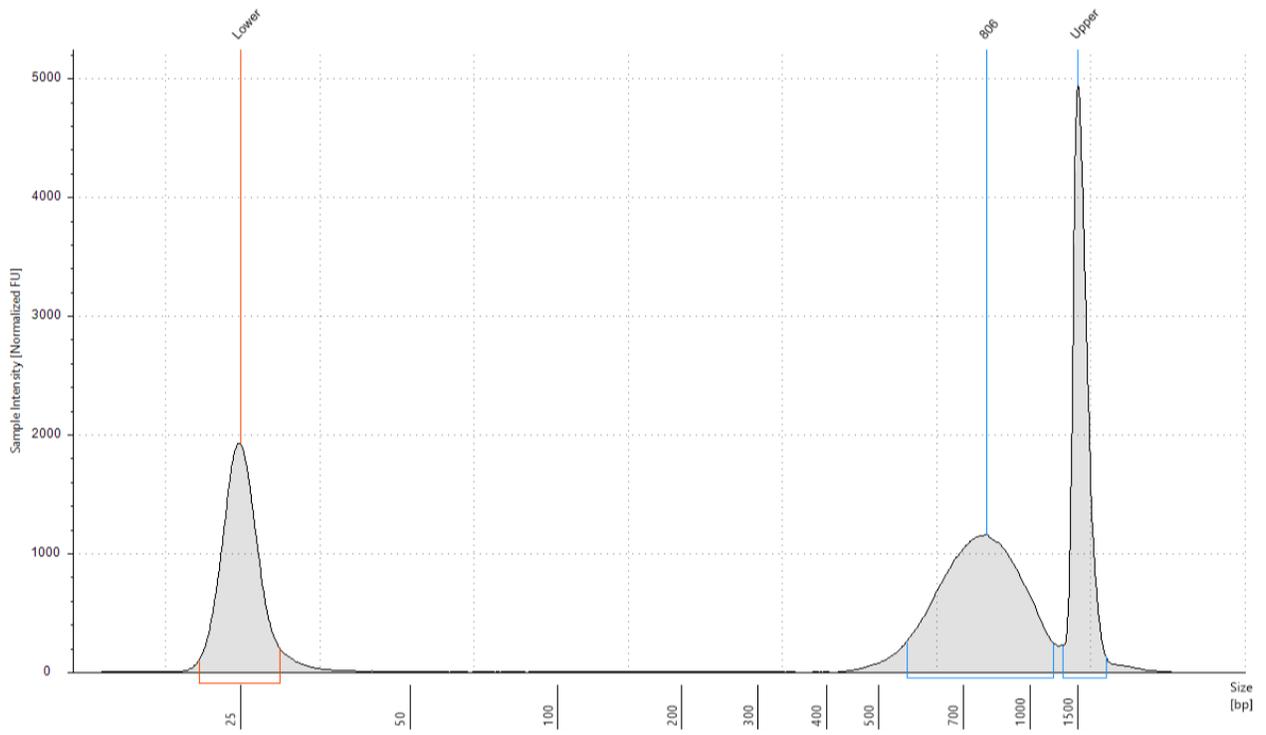


Figura 5.8.1: Imagen representativa de la traza de TapeStation para un pool de librerías enriquecidas.

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.

2. Prepare una solución de trabajo de 0,2 N 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.

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.

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

1. Añada 3 μ l de tampón de resuspensión a un tubo nuevo.
2. Añada 2 μ l de 10 nM PhiX al tubo.
3. Añada 5 μ l 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.
6. Añada 990 μ l de HT1 preenfriado al tubo que contiene PhiX desnaturalizado.
7. **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

1. Introduzca el volumen de dilución deseado en el cuaderno de trabajo para calcular la dilución adecuada para el PhiX.
2. Diluya PhiX a 5 pM combinando el volumen de reactivo (ver cuaderno) en un tubo de microcentrifugación.
3. **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)

1. Introduzca el volumen de dilución deseado en el cuaderno de trabajo para calcular la dilución adecuada para el PhiX.
2. Diluya PhiX a 20 pM combinando el volumen de reactivo (ver cuaderno) en un tubo de microcentrifugación.
3. **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

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 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.

2. 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.

3. Agite y realice un pulso de centrifugación 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 30 µl) a 4 nM en el cuaderno de trabajo para calcular la dilución adecuada para la librería.
6. Diluya el pool de muestras a 4 nM combinando los reactivos (consulte el cuaderno) en un tubo de microcentrifugación.
7. Agite y realice un pulso por centrifugación 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 centrifugación 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 centrifugación 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 librería.
15. Diluya el pool de muestras a la concentración de carga combinando los reactivos (consulte el cuaderno) en un tubo de microcentrifugación.
16. **Invierta para mezclar** (NO agite) y luego haga un pulso de centrifugación 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 centrifugación 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 librería.
6. Diluya el pool de muestras a 1 nM combinando los reactivos (consulte el cuaderno) en un tubo de microcentrifuga.
7. Agite y realice un pulso por centrifugación 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 centrifugación 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 centrifugación 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 centrifugación 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 librería.
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 microcentrífuga.
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.
	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

PROBLEMA	CAUSAS POSIBLES	Solución
		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 loci target 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 se 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.

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

Insumo	N.º de proveedor/catálogo
Uno de los siguientes kits de reactivos de secuenciación:	
<ul style="list-style-type: none"> • MiSeq V2 Standard (300 ciclos) • MiSeq V2 Micro (300 ciclos) MiSeq V2 Nano (300 ciclos) • Kit MiniSeq Mid Output (300 ciclos) • Reactivo iSeq 100 i1 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 	Thermo Fisher, 12321D Thermo Fisher, MR01
Soporte magnético-96	Thermo Fisher, AM10027
BioShake iQ, o bien	BioShake iQ, 1808-0506
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:	
<ul style="list-style-type: none"> • Termociclador Veriti™ de 96 pocillos • Termociclador Eppendorf 	Thermo Fisher, 4375786 Eppendorf, 6325000560
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:	
<ul style="list-style-type: none"> • Illumina MiSeq • Illumina MiniSeq • Illumina iSeq 	Illumina, SY-410-1003 Illumina, SY-410-1001 Illumina, 20021532

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 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 Bioanal 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 Bioanal 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	Autorizado por
1.0	19Feb20	Primera versión de AlloSeq Tx IFU CE. Editada por E. Naughton el 19Feb20	L. Westwood
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	L. Westwood
1.2	08May20	Actualización de sustancias interferentes. Reeditado por E. Naughton el 08May20	L. Westwood
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	L. Westwood
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	L. Westwood
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	L. Westwood
1.6	20Oct20	Se añadió una nota sobre el uso de NaOH. Reeditado por E. Naughton el 20 Oct 20	H. Hogan
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	S. Carnachan
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 	S. Carnachan

Versión	Fecha	Modificación	Autorizado por
		<ul style="list-style-type: none"> 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 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	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).	K. Hunter
5.0	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	K. Hunter
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	K. Hunter