



## Instruções de utilização

IFU095

N.º da versão: 6.0

Data de publicação: julho 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,  
Austrália



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



Qarad BV,  
Cipalstraat 3,  
2440 Geel,  
Bélgica



CareDx Pty Ltd

# Índice

1.	Visão geral.....	3
1.1	Princípio .....	3
1.2	Utilização prevista .....	4
1.3	Conteúdo de gene-alvo do AlloSeq Tx .....	4
1.4	Conteúdos do kit AlloSeq Tx e requisitos de armazenamento .....	4
1.5	Limitações e contraindicações .....	6
1.6	Requisitos para as amostras.....	6
1.7	Substâncias interferentes.....	6
1.8	Características de desempenho .....	8
1.9	Precisão .....	8
1.10	Especificidade.....	8
1.11	Reprodutibilidade e repetibilidade .....	9
1.12	Limite de deteção.....	9
1.13	Pressupostos .....	9
1.14	Segurança.....	10
2.	Preparação de biblioteca (fluxo de trabalho Pooling precoce).....	13
2.0	Introdução ao protocolo .....	13
2.1	Preparação da amostra .....	13
2.2	Preparação da biblioteca.....	13
2.3	Seleção de tamanho e purificação .....	16
2.4	Quantificação Qubit (opcional) .....	18
2.5	Visualização TapeStation (opcional).....	19
3.	Captura híbrida (fluxo de trabalho Pooling precoce).....	20
3.0	Introdução ao protocolo .....	20
3.1	Hibridação de sonda.....	20
3.2	Captura .....	22
3.3	PCR de pós-enriquecimento .....	23
3.4	Purificação do PCR de pós-enriquecimento .....	24
3.5	Quantificação Qubit .....	25
3.6	Visualização TapeStation (opcional).....	25
4.	Preparação de biblioteca (fluxo de trabalho Original).....	26
4.0	Introdução ao protocolo .....	26
4.1	Preparação da amostra .....	27
4.2	Preparação da biblioteca.....	27
4.3	Seleção de tamanho e purificação .....	30
4.4	Quantificação Qubit (opcional) .....	31
4.5	Visualização TapeStation (opcional).....	32
5.	Captura híbrida (fluxo de trabalho Original).....	33
5.0	Introdução ao protocolo .....	33
5.1	Pooling de amostras .....	33
5.2	Concentração de pool de biblioteca (opcional) .....	34
5.3	Hibridação de sonda.....	35
5.4	Captura .....	36
5.5	PCR de pós-enriquecimento .....	37
5.6	Purificação do PCR de pós-enriquecimento .....	38
5.7	Quantificação Qubit .....	39
5.8	Visualização TapeStation (opcional).....	40
6.	Sequenciação .....	41
6.0	Introdução ao protocolo .....	41

6.1	Preparação de PhiX .....	42
6.2	Diluir e desnaturar para MiSeq .....	43
6.3	Diluir e desnaturar para MiniSeq .....	44
6.4	Diluir para iSeq .....	45
7.	Análise de sequência.....	46
8.	Guia de resolução de problemas .....	46
9.	Informação de suporte .....	47
	Licença.....	47
	Consumíveis e equipamentos necessários, mas não fornecidos .....	47
10.	Informações de contacto.....	50
11.	Referências .....	51

# 1. Visão geral

## 1.1 Princípio

AlloSeq Tx é o nome da família de produtos de sequenciação de genes-alvo, concebidos para auxiliar na determinação da compatibilidade genética entre pacientes para transplante e potenciais doadores. O AlloSeq Tx utiliza a tecnologia de captura híbrida para enriquecer os genes de interesse a partir da preparação de uma biblioteca de genomas completos. A tecnologia de captura híbrida, por oposição a técnicas de PCR de longo alcance tradicionais, oferece benefícios ao nível de fluxo de trabalho e flexibilidade de conteúdos de gene/sequência variáveis sem necessidade de alterar os fluxos de trabalho.

Os kits AlloSeq Tx incluem:

- Reagentes para preparar bibliotecas de genomas completos,
- Sondas biotiniladas complementares para captação de alvos de sequência e
- Reagentes para enriquecer os alvos capturados para sequenciação.

A sequenciação é realizada num sequenciador Illumina (MiSeq, MiniSeq ou iSeq) e os dados de sequência resultantes são emitidos em ficheiros fastq, que são importados para o software AlloSeq Assign® para auxiliar na genotipagem.

Este documento de *Instruções de utilização* descreve o procedimento para utilização da família de produtos CareDx AlloSeq Tx. O conteúdo de gene-alvo de cada produto AlloSeq Tx específico é apresentado na tabela *Conteúdo de gene-alvo* abaixo.

Para auxiliar no processamento de amostras laboratoriais e na conservação de registos, também são fornecidos livros de trabalho do Excel acerca de cada processo. Os livros de trabalho auxiliam nos cálculos dos volumes de reagentes e na criação de fichas de dados da amostra para a sequenciação. Os livros de trabalho de suporte incluem:

*Livro de trabalho de preparação de biblioteca CE IVD IFU095-1\_AlloSeq Tx*

*Livro de trabalho de captura híbrida CE IVD IFU095-2\_AlloSeq Tx*

*Livro de trabalho de sequenciação CE IVD IFU095-3\_AlloSeq Tx*

*Livro de trabalho de pooling precoce CE IVD IFU095-5\_AlloSeq Tx*

Este documento refere duas opções de fluxo de trabalho: Fluxo de trabalho Original e fluxo de trabalho Pooling precoce. O fluxo de trabalho Pooling precoce agrupa amostras imediatamente após a indexação num único tubo para todos os passos subsequentes. No fluxo de trabalho Pooling precoce, a seleção de fragmentos e purificação é feita no tubo ao invés de ser feita na placa, bem como o passo de concentração opcional durante o processamento > 12 amostras/execução. Este fluxo de trabalho permite ao utilizador conduzir as amostras até ao sequenciamento num único turno de trabalho. Este fluxo de trabalho é adequado a laboratórios que não utilizam a automação e preferem um protocolo com menos tempo de manipulação, menor utilização de consumíveis e 46% menos passos de pipetagem em comparação com o fluxo de trabalho original. *O Livro de trabalho de pooling precoce CE IVD IFU095-5\_AlloSeq Tx* deve ser utilizado em conjunto com o fluxo de trabalho Pooling precoce.

O formato baseado numa placa do fluxo de trabalho Original é adequado aos laboratórios que optem por automatizar este procedimento. *O Livro de trabalho de preparação de biblioteca CE IVD IFU095-1\_AlloSeq Tx*, *Livro de trabalho de captura híbrida CE IVD IFU095-2\_AlloSeq Tx* e *o Livro de trabalho de sequenciação CE IVD IFU095-3\_AlloSeq Tx* devem ser utilizados em conjunto com o fluxo de trabalho Original.

O kit destina-se a uma utilização por pessoal qualificado em laboratórios regulamentados. Os produtos devem ser manuseados com a devida atenção e cuidado. Recomendamos que todos os utilizadores leiam as Instruções de utilização na íntegra, nomeadamente, a secção *Segurança*, antes de iniciarem o procedimento. Os procedimentos para utilização do software AlloSeq Assign podem ser consultados nas Instruções de utilização do software AlloSeq Assign.

## 1.2 Utilização prevista

AlloSeq Tx é o nome da família de produtos de sequenciamento de genes-alvo, concebidos para auxiliar na determinação da compatibilidade genética entre pacientes para transplante e potenciais doadores; incluindo sondas para enriquecimento direcionado de até 17 loci.

Os kits de tipagem AlloSeq Tx 17 são testes qualitativos para a tipagem de ADN de HLA-A, B, C, E, F, G, H, DRB1/3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1, MICA e MICB, de modo a auxiliar na correspondência genética para transplante de órgãos ou células estaminais.

Os kits de tipagem AlloSeq Tx 9 são testes qualitativos para a tipagem de ADN de HLA-A, B, C, DRB1/3/4/5, DQB1 e DPB1, de modo a auxiliar na correspondência genética para transplante de órgãos ou células estaminais.

O produto destina-se a uma utilização com sequenciadores Illumina MiSeq, MiniSeq e iSeq, em conjunto com o software de interpretação AlloSeq Assign.

Este dispositivo destina-se a uma utilização por pessoal devidamente qualificado, com conhecimentos acerca da frequência dos tipos de HLA na sua população, em laboratórios devidamente regulados que realizem a tipagem de tecidos (HLA) para doadores e recipientes compatíveis para transplantação.

Os produtos AlloSeq Tx destinam-se apenas a uma utilização profissional e não podem ser utilizados como base exclusiva para a tomada de decisões clínicas. Os kits AlloSeq Tx não devem ser utilizados para diagnóstico de doenças.

## 1.3 Conteúdo de gene-alvo do AlloSeq Tx

Nome do produto	Código do produto	Genes-alvo	Tamanho do kit	Capacidade de sequenciação
AlloSeq Tx 17	ASTX17.1(24)-IVD	HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -H, -DRB1/3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1, MICA e MICB	24 preparações de biblioteca 4 enriquecimentos (entre 6-24 amostras por enriquecimento)	≤24 amostras no MiSeq Micro Flowcell ≤6 amostras no MiSeq Nano Flowcell ≤24 amostras no iSeq ≤24 amostras no 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 e MICB	96 preparações de biblioteca 8 enriquecimentos (entre 12-96 amostras por enriquecimento)	≤96 amostras no MiSeq v2 Standard Flowcell ≤24 amostras no MiSeq Micro Flowcell ≤6 amostras no MiSeq Nano Flowcell ≤48 amostras no iSeq ≤24 amostras no 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 e -DPB1	96 preparações de biblioteca 8 enriquecimentos (entre 12-96 amostras por enriquecimento)	≤96 amostras no MiSeq Standard Flowcell ≤24 amostras no MiSeq Micro Flowcell ≤6 amostras no MiSeq Nano Flowcell ≤48 amostras no iSeq ≤24 amostras no MiniSeq MidOutput Flowcell
AlloSeq Tx 9	ASTX9.1(96)-B-IVD			

## 1.4 Conteúdos do kit AlloSeq Tx e requisitos de armazenamento

Quando armazenados de acordo com as especificações de temperatura abaixo indicadas, os componentes do kit podem ser utilizados até à data de validade indicada nas caixas exteriores do kit e toleram até 12 ciclos de congelamento-

descongelamento. Após a utilização, os kits/componentes devem ser imediatamente armazenados nas condições corretas de armazenamento.

Estudos de estabilidade acelerada estão ainda a ser realizados para avaliar a possibilidade de um aumento deste intervalo temporal. Embora estejam a ser realizados testes de confirmação em tempo real, recomendamos vivamente que estes kits NÃO sejam utilizados além da sua data de validade.

#### Caixa de reagentes 1 de 5, armazenar a uma temperatura entre -15 e -25 °C

Reagente	Quantidade (24 testes)	Tamanho/tipo de tubo (24 testes)	Quantidade (96 testes)	Tamanho/tipo de tubo (96 testes)
Tagmentation Beads	1	0.5mL	1	1.5mL
Tagmentation Buffer	1	0.5mL	1	1.5mL
PCR Mix-1	N/A	N/A	1	5mL

#### Caixa de reagentes 2 de 5, armazenar a uma temperatura entre 15 e 30 °C

Reagente	Quantidade (24 testes)	Tamanho/tipo de tubo (24 testes)	Quantidade (96 testes)	Tamanho/tipo de tubo (96 testes)
Stop Buffer	1	1.5mL	2	2mL
Tagmentation Wash Buffer	2	5mL	1	50mL

#### Caixa de reagentes 3 de 5, armazenar a uma temperatura entre -15 e -25 °C

Reagente	Quantidade (24 testes)	Tamanho/tipo de tubo (24 testes)	Quantidade (96 testes)	Tamanho/tipo de tubo (96 testes)
AlloSeq Tx Index Primers	1 conjunto (10x)	Tubo FluidX	1 placa	Placa de 96 poços

#### Caixa de reagentes 4 de 5, armazenar a uma temperatura entre -15 e -25 °C

Reagente	Quantidade (24 testes)	Tamanho/tipo de tubo (24 testes)	Quantidade (96 testes)	Tamanho/tipo de tubo (96 testes)
Product Specific AlloSeq Tx Probes	1	0.5mL	1	0.5mL
PCR Mix	1	1.5mL	N/A	N/A
PCR Mix-2	N/A	N/A	1	0.5mL
PCR Primers	1	0.5mL	1	0.5mL
Hybridisation Buffer 1	1	1,5 ml, cónico	1	1,5 ml, Cónico
Capture Wash Buffer	4	1,5 ml, cónico âmbar	8	1,5 ml, cónico âmbar
Capture Elution Buffer 1	1	0.5mL	1	0.5mL
2N NaOH	1	0.5mL	2	0.5mL

#### Caixa de reagentes 5 de 5, armazenar a uma temperatura entre 2 e 8 °C

Reagente	Quantidade (24 testes)	Tamanho/tipo de tubo (24 testes)	Quantidade (96 testes)	Tamanho/tipo de tubo (96 testes)
Purification Beads	1	5mL	N/A	N/A

Purification Beads-1	N/A	N/A	3	5mL
Purification Beads-2	N/A	N/A	1	0.5mL
Resuspension Buffer	2	1.5mL	2	5mL
Capture Beads	1	1.5mL	1	5mL
Hybridisation Buffer 2	1	0.5mL	1	0.5mL
Capture Elution Buffer 2	1	0.5mL	1	0.5mL

## 1.5 Limitações e contraindicações

- Recomendamos vivamente que estes kits sejam validados pelo utilizador antes da implementação em laboratório utilizando amostras cujo genótipo tenha sido determinado por outros procedimentos de base molecular.
- Recomendamos vivamente que o utilizador siga todas as instruções indicadas nos rótulos do produto. Não são recomendados quaisquer desvios em relação ao procedimento descrito, pois podem não ser suportados e resultar em erros de tipagem.
- Recomendamos um controlo positivo (ADN humano) e um controlo negativo (utilizando água esterilizada em vez de ADN) que seja incluído em cada execução de preparação de biblioteca. O controlo positivo tem de produzir uma biblioteca quantificável (medida por Qubit ou por métricas de cobertura de sequenciação) e a sequência resultante tem de ser concordante com o genótipo esperado da amostra. Não pode existir uma biblioteca quantificável (medida por Qubit ou comunicada como Baixa cobertura no Assign) no controlo de modelo negativo para cada experiência. Se for produzida uma biblioteca quantificável para o controlo de modelo negativo, a execução tem de ser repetida.
- O ensaio AlloSeq Tx sequencia fragmentos de ADN com um tamanho de inserção médio de 500 bp, o que significa que polimorfismos com um distanciamento superior a 500 bp não podem ser faseados, o que pode resultar em ambiguidades heterozigóticas.

## 1.6 Requisitos para as amostras

ADN genómico humano peso molecular de elevado (suspenso em tampão Tris/EDTA e OD260/280 > 1,8) extraído de amostras de sangue anticoagulado ACD ou EDTA. NÃO utilize amostras de sangue com heparina. Este método também pode ser utilizado com exsudado bucal de ADN.

**Importante:** Todas as referências a exsudado bucal de ADN neste documento destinam-se apenas a uma utilização para investigação. **O exsudado bucal de ADN não foi validado com este método para utilização para diagnóstico.**

## 1.7 Substâncias interferentes

A CareDx Pty Ltd identificou todas as substâncias interferentes potenciais conhecidas que podem ter um impacto no teste. Consulte a tabela abaixo.

Inibidor	Fonte potencial	Risco	Comentários
EDTA	Tampão TE, tubos de colheita de sangue	Muito baixo	Ressuspenda o ADN em Tris-HCl pH8 ou TE com <1 mM EDTA. Utilize kits de preparação de ADN de sangue comerciais e/ou evite tubos de colheita de sangue EDTA
Álcoois	Etanol, isopropanol, álcool isoamílico	Baixo	Certifique-se de que os pellets ou esferas de ADN são secados ao ar e inspecionados visualmente quanto a gotículas de etanol (1% etanol = 1,25 ul 80% etanol numa reação PCR de 100 ul). Existem múltiplos passos de lavagem de etanol a 80% no protocolo AlloSeq Tx, tornando a inibição devido a transferência de etanol um risco baixo, mas ligeiramente mais elevado do que o risco de outros fatores.

Inibidor	Fonte potencial	Risco	Comentários
Sais em excesso	KCl, NaCl, CsCl, NaAc	Muito baixo	Assegure uma boa lavagem dos pellets ou esferas de ADN com etanol a 80%. Assegure que o OD 260/230 para ADN genómico inicial é ~2
Sais caotrópicos	Cl de guanidínio; MgCL <sub>2</sub> ; ureia	Muito baixo	Assegure uma boa lavagem dos pellets ou esferas de ADN com etanol a 80%. Assegure que o OD 260/230 para ADN genómico inicial é ~2
Fenol:clorofórmio	Transferência orgânica	Muito baixo	Um componente do amplamente utilizado procedimento comercial de extração de ADN Trizol. Assegure uma boa lavagem dos pellets ou esferas de ADN com etanol a 80%. Assegure que o OD 260/230 para ADN genómico inicial é ~2
Proteínas	BSA, PEG, albumina de sangue	Muito baixo	Utilize kits de preparação de ADN de sangue comerciais. Assegure que o OD 260/280 para ADN genómico inicial é >1,8
Heme, hemoglobina, imunoglobulinas	Sangue	Muito baixo	Evite utilizar amostras de sangue com hemólise exagerada. Utilize kits de preparação de ADN de sangue comerciais. Assegure que o OD 260/280 para ADN genómico inicial é >1,8
Detergentes/DDT	Desoxicolato de sódio, sarcosil, SDS, NP40, Tween 20, Triton X-100, N-octilglucósido	Muito baixo	Assegure uma boa lavagem dos pellets ou esferas de ADN com etanol a 80%. Assegure que o OD 260/230 para ADN genómico inicial é ~2
Proteases	Proteinase K, tratamento de amostra	Muito baixo	Utilize kits de preparação de ADN de sangue ou saliva comerciais. Use sempre luvas
Nucleases	Tratamento de amostra, enzimas de restrição, nuclease microcócica	Muito baixo	Utilize kits de preparação de ADN de sangue comerciais. Use sempre luvas
ADN exógeno/ARN	Transferência, contaminação	Muito baixo	Prepare o ADN genómico numa área pré-PCR dedicada
Transportadores	ARN, heparina, glicogénio	Muito baixo	Utilize kits de preparação de ADN de sangue comerciais e/ou evite tubos de colheita de sangue com heparina
Iões de metal em excesso	Mg <sup>2+</sup> de tampão de PCR, iões Fe	Muito baixo	Assegure uma boa lavagem dos pellets ou esferas de ADN com etanol a 80%. Assegure que o OD 260/230 para ADN genómico inicial é ~2
Medicamentos antivirais (por ex., aciclovir)	Sangue	Muito baixo	Utilize kits de preparação de ADN de sangue comerciais. Assegure que o OD 260/280 para ADN genómico inicial é >1,8
Pó de luvas	Luvas com pó	Muito baixo	Use luvas sem pó
Tubos PCR sujeitos a radiação UV	Tubos PCR com tratamento UV	Muito baixo	Evite o tratamento UV de artigos em plástico
Biotina	De fármacos que interagem com estreptavidina	Muito baixo	Existem numerosas lavagens de purificação entre a colheita de amostra e o passo de captura híbrida no protocolo que permitem a remoção das moléculas de biotina.

Inibidor	Fonte potencial	Risco	Comentários
			No caso de um ensaio de captura híbrida, a presença de biotina (improvável, conforme referido acima) não origina um resultado erróneo. Pode provocar uma redução da eficiência do enriquecimento, o que seria detetado como um baixo desempenho de enriquecimento ou não produziria qualquer resultado.

## 1.8 Características de desempenho

O desempenho do ensaio foi avaliado utilizando um painel de amostras de ADN com genótipos conhecidos, incluindo amostras de controlo internas da CareDx, amostras da International Histocompatibility Workshop (IHW) HLA Reference Standards e amostras obtidas da International HLA DNA Exchange, Universidade da Califórnia, Los Angeles (UCLA). O desempenho de preparação de biblioteca, enriquecimento e sequenciação foi avaliado de acordo com critérios de aceitação definidos.

## 1.9 Precisão

O produto AlloSeq Tx, em conjunto com o software AlloSeq Assign, foi concebido para cumprir a norma da ASHI (Sociedade Americana de Histocompatibilidade e Imunogenética), assim como a norma da EFI (Federação Europeia de Imunogenética) para tipagem HLA.

Nos estudos de verificação e validação, o produto AlloSeq Tx, em conjunto com AlloSeq Assign, foi utilizado para avaliar a concordância de genotipagem com amostras tipadas através de um método alternativo. As amostras de controlo interno foram tipadas utilizando tipagem baseada em sequências (SBT). As amostras de repositórios reconhecidos internacionalmente da IHW e UCLA foram utilizadas como parte dos estudos de verificação e foram tipadas utilizando vários métodos, incluindo SBT, SSP e SSO. Estas são amostras de ADN caracterizadas que representam os alelos de HLA mais prevalentes e alelos raros selecionados.

Resumo do resultado obtido através dos estudos de verificação e validação:

MÉTRICA	PAINEL	TAMANHO DO PAINEL (n)	RESULTADO
Concordância de genotipagem	Interna	190	100%
Concordância de genotipagem	UCLA	24	98,12%
Concordância de genotipagem	IHW	48	98,06%
Concordância de genotipagem	Locais de teste beta	124	99,54%
<b>Concordância total/geral</b>			<b>99,49%</b>

Em todos os casos de discordância observados nos estudos de verificação/validação, estima-se que a discordância está relacionada com limitações do método ou tecnologia de tipagem anterior.

## 1.10 Especificidade

A especificidade no contexto dos ensaios AlloSeq Tx descreve a percentagem de leituras de sequência (representando fragmentos de ADN capturados pelo ensaio) que fazem o mapeamento para loci que não os loci alvo. Todos os ensaios de tipagem HLA baseados em alguma forma de hibridação entre o ADN genómico e os reagentes de sequência de oligonucleótido, independentemente de serem ensaios de PCR ou ensaios de captura híbrida, terão o elemento de “ausência” de especificidade. Isto resulta do facto de muitos genes no genoma humano fazerem parte de famílias

multigene. Os genes HLA não são diferentes. HLA-A, -B, e -C fazem parte da família de genes HLA classe 1. Contudo, além dos genes bem conhecidos, existem pseudogenes HLA e fragmentos de gene e possíveis genes funcionais não descritos que são suscetíveis de serem capturados pelas características de especificidade inerente dos ensaios de captura híbrida. O número completo desses genes não é conhecido, mas varia entre genomas de indivíduos diferentes.

Para o AlloSeq Tx, a especificidade é capturada através de “leituras fora do alvo”. O objetivo do ensaio AlloSeq Tx é obter um nível de especificidade pelo qual:

1. As leituras não específicas NÃO resultam em leituras de alvo demasiado baixas em número para a realização de uma genotipagem correta,
2. As leituras não específicas NÃO contribuem para a sequência de consenso dos loci alvo,
3. Uma alta especificidade compromete a sensibilidade e algumas regiões dos alelos não são capturadas.

O AlloSeq Assign consegue identificar leituras não específicas ou fora do alvo e representa-as relativamente ao número total de leituras capturadas. Estes dados são utilizados como métrica de controlo de qualidade para o desempenho do ensaio. Uma especificidade demasiado alta ou demasiado baixa pode indicar temperaturas e tempos de hibridação incorretos e problemas de qualidade do reagente e da sonda.

Os dados de verificação revelaram que uma especificidade tão baixa quanto 12% não tem impacto no ensaio, enquanto os valores de especificidade típicos situam-se no intervalo de 64 e 92%. Uma especificidade completa é improvável e seria um indicador de potenciais problemas de qualidade. Apesar de a estratégia de conceção da sonda reduzir a probabilidade de alelos em falta, o paradigma sensibilidade vs. especificidade permanece válido. Ou seja, uma certa redução de especificidade garantirá sensibilidade completa e alelos completos, e inclusivamente os alelos novos serão sequenciados com sucesso.

### **1.11 Reprodutibilidade e repetibilidade**

O produto AlloSeq Tx, em conjunto com o software AlloSeq Assign, demonstrou oferecer resultados equivalentes em diferentes lotes, num estudo de verificação lote a lote, e em diferentes laboratórios, com diferentes utilizadores e instrumentos, o que foi comprovado num processo de verificação e validação realizado em quatro locais externos. O produto AlloSeq Tx demonstrou oferecer resultados equivalentes para a mesma amostra em execuções repetidas.

### **1.12 Limite de deteção**

A quantidade recomendada de ADN genómico humano de elevado peso molecular é de 100-1000 ng. Os testes internos demonstraram que também podem ser utilizadas amostras com introdução de ADN tão reduzida quanto 50 ng. Os genótipos corretos também foram obtidos a partir de ADN de má qualidade ou baixa.

### **1.13 Pressupostos**

- Os instrumentos têm de ser corretamente calibrados e conservados, de acordo com um plano de manutenção, conforme necessário.
- Procedimentos operativos normalizados (SOP) estão implementados e são controlados.
- O kit é utilizado por pessoal de laboratório qualificado e autorizado
- Os reagentes são utilizados dentro dos prazos de validade indicados.
- NÃO são utilizados em conjunto reagentes de diferentes lotes de kit. Isto pode afetar o desempenho do kit
- Apenas são utilizados os reagentes registados neste documento como não incluídos, mas necessários.
- É tomado especial cuidado para evitar uma contaminação cruzada de amostras de ADN ou misturas de amostras
- É tomado especial cuidado em todas as fases para evitar derrames
- Os manuais fornecidos pelo fabricante são utilizados em conjunto com este documento

## 1.14 Segurança

Siga as práticas gerais de segurança de laboratório e práticas de prevenção de contaminação de sala assética quando realizar este procedimento. Através do processo de gestão de riscos da CareDx Pty Ltd, todos os riscos foram mitigados até um limite aceitável. As instruções de utilização devem ser seguidas, incluindo os manuais fornecidos, para evitar cenários de utilização perigosos. Neste kit, estão presentes materiais perigosos. Consulte as Fichas de dados de segurança e tome todas as precauções necessárias durante o manuseamento e a eliminação.

COMPONENTE DO KIT	SÍMBOLO/PICTOGRAMAS	AVISO DE SEGURANÇA
<p><b><u>TAGMENTATION BUFFER</u></b>            Contém N,N-Dimetilformamida</p>		<p><b>Palavra de sinalização:</b> Perigo</p> <p><b>Declarações de perigo:</b>            H319 - Provoca irritação ocular grave            H332 – Nocivo por inalação            H350 – Pode provocar cancro            H360 – Pode afetar a fertilidade ou o nascituro</p> <p><b>Recomendações de prudência – UE (§28, 1272/2008)</b>            P201 – Pedir instruções específicas antes da utilização            P202 – Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança            P261 – Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis            P270 – Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto            P280 – Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial            P264 – Lavar o rosto, as mãos e toda a pele exposta cuidadosamente após manuseamento            P272 – A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho            P308 + P313 – EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Consultar um médico            P304 + P340 – EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração            P313 – Consultar um médico            P305 + P351 + P338 – SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar            P337 + P313 – Se a irritação ocular persistir: Consultar um médico            P405 – Armazenar em local fechado à chave            P501 – Eliminar o conteúdo/recipiente num local de eliminação de resíduos aprovado</p>
<p><b><u>PCR MIX</u></b>            Contém cloreto de tetrametilamónio</p>		<p><b>Palavra de sinalização</b> Perigo</p> <p><b>Declarações de perigo</b>            H302 – Nocivo por ingestão            H371 – Pode afetar os órgãos            H412 – Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros</p> <p><b>Recomendações de prudência – UE (§28, 1272/2008)</b>            P260 – Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis            P270 – Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto            P280 – Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial            P264 – Lavar o rosto, as mãos e toda a pele exposta cuidadosamente após manuseamento</p>

COMPONENTE DO KIT	SÍMBOLO/PICTOGRAMAS	AVISO DE SEGURANÇA
		<p>P272 – A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho</p> <p>P273 – Evitar a libertação para o ambiente</p> <p>P308 + P313 – EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Consultar um médico</p> <p>P301 + P312 – EM CASO DE INGESTÃO: Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico</p> <p>P330 – Enxaguar a boca</p> <p>P405 – Armazenar em local fechado à chave</p> <p>P501 – Eliminar o conteúdo/recipiente num local de eliminação de resíduos aprovado</p>
<p><b>2N NaOH</b> Contém hidróxido de sódio</p>		<p><b>Palavra de sinalização</b> Perigo</p> <p><b>Declarações de perigo</b> H314 – Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves H318 – Provoca lesões oculares graves</p> <p><b>Recomendações de prudência – UE (§28, 1272/2008)</b> P260 – Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis P264 – Lavar o rosto, as mãos e toda a pele exposta cuidadosamente após manuseamento P280 – Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial P301 + P330 + P331 – EM CASO DE INGESTÃO: enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito P303 + P361 + P353 – SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): Retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche P363 – Lavar a roupa contaminada antes de a voltar a usar P310 – Contactar imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico P304 + P340 – EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração P305 + P351 + P338 – SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar P405 – Armazenar em local fechado à chave P501 – Eliminar o conteúdo/recipiente de acordo com os regulamentos locais, regionais, nacionais e internacionais aplicáveis</p>
<p><b>CAPTURE BEADS</b> Contém formamida</p>		<p><b>Palavra de sinalização</b> Perigo</p> <p><b>Declarações de perigo</b> H351 – Suspeito de provocar cancro H360 – Pode afetar a fertilidade ou o nascituro H373 – Pode afetar os órgãos após exposição prolongada ou repetida</p> <p><b>Recomendações de prudência – UE (§28, 1272/2008)</b> P201 – Pedir instruções específicas antes da utilização P202 – Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança P260 – Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis P270 – Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto P280 – Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial P264 – Lavar o rosto, as mãos e toda a pele exposta cuidadosamente após manuseamento</p>

COMPONENTE DO KIT	SÍMBOLO/PICTOGRAMAS	AVISO DE SEGURANÇA
		<p>P272 – A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho</p> <p>P308 + P313 – EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Consultar um médico</p> <p>P405 – Armazenar em local fechado à chave</p> <p>P501 – Eliminar o conteúdo/recipiente num local de eliminação de resíduos aprovado</p>
<p><b>HYBRIDISATION BUFFER 1</b> Contém formamida</p>		<p><b>Palavra de sinalização</b> Perigo</p> <p><b>Declarações de perigo</b> H351 – Suspeito de provocar cancro H360 – Pode afetar a fertilidade ou o nascituro</p> <p><b>Recomendações de prudência – UE (§28, 1272/2008)</b> P201 – Pedir instruções específicas antes da utilização P202 – Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança P261 – Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis P270 – Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto P280 – Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial P264 – Lavar o rosto, as mãos e toda a pele exposta cuidadosamente após manuseamento P272 – A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho P308 + P313 – EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Consultar um médico P405 – Armazenar em local fechado à chave P501 – Eliminar o conteúdo/recipiente num local de eliminação de resíduos aprovado</p>
<p><b>STOP BUFFER</b> Contém dodecilsulfato de sódio</p>		<p><b>Palavra de sinalização</b> Aviso</p> <p><b>Declarações de perigo</b> H319 - Provoca irritação ocular grave</p> <p><b>Recomendações de prudência – UE (§28, 1272/2008)</b> P264 – Lavar o rosto, as mãos e toda a pele exposta cuidadosamente após manuseamento P280 – Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial P305 + P351 + P338 – SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar P337 + P313 – Se a irritação ocular persistir: Consultar um médico</p>

**NOTA:** o componente “Purification Beads” contém azida de sódio (<0,1%), numa concentração que não é considerada perigosa, de acordo com a Diretiva CE 1272/2008 (CRE/GHS), as Diretivas CE 1999/45/CE e 67/548/CEE ou US-OSHA (HCS 29 CFR 1910.1200) e UN GHS.

Para obter informações adicionais sobre todos os materiais perigosos presentes no kit AlloSeq Tx, consulte a Ficha de dados de segurança TEC478\_AlloSeq Tx em <http://www.caredx.com>.

## 2. Preparação de biblioteca (fluxo de trabalho Pooling precoce)

### 2.0 Introdução ao protocolo

- Siga o protocolo AlloSeq Tx abaixo pela ordem indicada utilizando os parâmetros especificados.
- Antes de continuar, confirme os conteúdos do kit e certifique-se de que está presente o equipamento e os consumíveis necessários.
- Para maior facilidade de utilização, os passos do protocolo para a Preparação de biblioteca também são descritos detalhadamente no *Livro de trabalho de pooling precoce CE IVD IFU095-5\_AlloSeq Tx*. As referências ao livro de trabalho constantes no Capítulo 2 dizem respeito a este livro de trabalho.

### 2.1 Preparação da amostra

1. Introduza um ID de experiência, descrição, operador e data no livro de trabalho.
2. Selecione o conjunto de sonda AlloSeq a ser utilizado na experiência a partir do menu pendente do livro de trabalho.
3. Selecione o tipo de sequenciador a ser utilizado a partir do menu pendente do livro de trabalho. Uma vez selecionado o tipo de sequenciador, o livro de trabalho apresenta as instruções de sequenciação.
4. Introduza o ID das amostras a serem testadas na secção amarela do modelo de placa no livro de trabalho, de acordo com a configuração pretendida.

**NOTA:** só podem ser introduzidos caracteres alfanuméricos. Os IDs de amostra duplicados serão assinalados a vermelho para serem corrigidos pelo utilizador. O software do sequenciador exige que haja apenas um ID de amostra por execução. Não introduza qualquer informação para poços que não irão conter qualquer amostra.

5. Selecione o conjunto de índice pretendido a partir da caixa pendente laranja por baixo de Modelo de placa.
6. Se for necessário e estiver a utilizar o formato de índice tubular, a ordem do índice i7 pode ser alterada; selecione o índice i7 alternativo a ser utilizado a partir das opções da lista pendente para a coluna necessária. Caso sejam selecionados índices i7 duplicados, as células serão assinaladas a vermelho para serem corrigidas pelo utilizador.
7. Se for necessário e estiver a utilizar o formato de índice tubular, a ordem do índice i5 pode ser alterada; selecione o índice i5 a ser utilizado a partir das opções da lista pendente para a linha necessária. Caso sejam selecionados índices i5 duplicados, as células serão assinaladas a vermelho para serem corrigidas pelo utilizador.
8. Uma vez completadas todas as ações acima, clique no separador 1.2 SampleSheet e reveja. Será utilizado texto a vermelho para assinalar os locais onde ainda é necessário introduzir informação. Se não for apresentado texto a vermelho, o separador SampleSheet pode ser guardado como CSV (delimitado por vírgulas) (\*.csv). Guarde o ficheiro como "SampleSheet.csv". No formato CSV, só o separador ativo é guardado. Abra o ficheiro SampleSheet.csv guardado no Excel e elimine quaisquer linhas vazias na tabela [Dados], ou seja, quaisquer linhas entre 22 e 117 que não incluam informação da amostra. Após fazer isto, guarde o ficheiro. A Ficha de dados da amostra está pronta para ser importada para o sequenciador Illumina.

### 2.2 Preparação da biblioteca

1. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por amostra (µL)	Preparação necessária
Tagmentation Buffer	-15 °C a -25 °C CAIXA 1	10	Coloque à temperatura ambiente.
Água esterilizada	15°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	30	Nenhuma preparação necessária.
Tagmentation Beads	-15 °C a -25 °C CAIXA 1	10	<b>Coloque à temperatura ambiente durante, pelo menos, 30 minutos.</b>
Stop Buffer	15°C a 30°C CAIXA 2	10	Nenhuma preparação necessária.
Tagmentation Wash Buffer	15°C a 30°C CAIXA 2	300	Nenhuma preparação necessária.
PCR Mix (ou PCR Mix-1 para kit de 96)	-15 °C a -25 °C CAIXA 4 (ou Caixa 1 para PCR Mix-1)	20	Descongele e mantenha em gelo. <b>Armazene novamente após a utilização para os passos subsequentes.</b>
Índices: <b>ASTX17.1(24)-IVD:</b> H503, H505, H506, H517, H705, H706, H707, H710, H711, H714 <b>ASTX17.1(24)-B-IVD:</b> H502, H507, H508, H521, H701, H702, H703, H704, H712, H715 <b>ASTX17.1(96)-A-IVD/ASTX9.1(96)-A-IVD:</b> H503, H505, H506, H517, H502, H507, H508, H521, H705, H706, H707, H710, H711, H714, H701, H702, H703, H704, H712, H715 <b>ASTX17.1(96)-B-IVD/ASTX9.1(96)-B-IVD:</b> 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 CAIXA 3	Total de 10	Descongele e mantenha em gelo.

- Homogeneíze por vórtice e centrifugue todos os reagentes antes de utilizar.
- Reúna a placa de 96 poços, o Microseal B e os tubos de microcentrifugação de 1,5 ml.

**NOTA:** não existe um ponto de paragem segura até ao PCR de indexação. O processo demora aproximadamente **1:50** horas (incluindo 50 min. de termociclagem de PCR).

- Para cada amostra de ADN, distribua uma alíquota de 10 µL da amostra de 10-100 ng/µL no poço apropriado de uma placa PCR de acordo com o modelo de placa da folha 1.0 Sample\_Prep.
- Prepare uma mistura master de tagmentação de 40 µL por amostra utilizando 10 µL de Tagmentation Buffer, 20 µL de água esterilizada e 10 µL de Tagmentation Beads.
- Prepare a mistura master com um vórtice e, em seguida, centrifugue.
- Efetue a pipetagem de 40 µL de mistura master de tagmentação em cada poço com uma amostra de ADN.
- Sele a placa com o Microseal B.
- Centrifugue a placa a 100 x g durante 10 segundos para recolher todos os reagentes no fundo do poço.
- Utilize o agitador de placa para misturar a 1800 rpm durante 1 minuto.
- Inspeccione visualmente a placa:

a) Se as esferas não estiverem distribuídas de forma homogênea no poço, repita a agitação de acordo com o passo 10.

b) Se o material não estiver no fundo do poço ou tiver salpicado para o Microseal B, centrifugue e repita a agitação de acordo com o passo 10.

12. Coloque a placa no termociclador e execute o programa de tagmentação utilizando a tampa aquecida a 105 °C e um volume de reação de 50 µL:

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

13. Quando o programa terminar, retire imediatamente a placa do termociclador e deixe à temperatura ambiente durante 2 minutos.

14. Retire o Microseal B.

15. Adicione 10 µL de Stop Buffer a cada poço de reação.

16. Sele novamente a placa com um novo Microseal B.

17. Utilize o agitador de placa para misturar a 1800 rpm durante 1 minuto.

18. Incube a placa durante 5 minutos adicionais à temperatura ambiente.

19. Durante a incubação, retire o PCR Mix e os índices do congelador para descongelarem e, em seguida, coloque numa prateleira de gelo/fria.

20. Inspeção visualmente a placa e, se o material não estiver no fundo do poço ou tiver salpicado para o Microseal B, centrifugue a placa.

21. Lave três vezes com o Tagmentation Wash Buffer, conforme descrito abaixo:

a) Remova o Microseal B e coloque a placa no Magnetic Stand-96 durante 30 segundos, deixando as esferas agruparem-se nos poços junto ao íman.

b) Utilizando uma pipeta, aspire e elimine o sobrenadante, deixando as esferas nos poços junto ao íman.

c) Adicione lentamente 100 µL de Tagmentation Wash Buffer em cada poço.

d) Sele novamente a placa com um novo Microseal B. Assegure que o Microseal adere corretamente.

e) Utilize o agitador de placa para misturar a 1800 rpm durante 2 minutos à temperatura ambiente.

f) **CUIDADO:** Se as amostras tiverem salpicado para o vedante, centrifugue a 100 x g durante 10 s antes de remover o selo,

g) Repita os passos a) a f) mais duas vezes, num total de 3 lavagens.

**NOTA:** antes de eliminar o sobrenadante da terceira lavagem, prepare a mistura de PCR master conforme descrito abaixo.

22. Prepare uma mistura de PCR master de 40 µL utilizando 20 µL de água esterilizada e 20 µL de PCR Mix. (ou PCR Mix-1 se utilizar kits de 96 testes).

**NOTA:** o PCR Mix é utilizado para os passos subsequentes no protocolo. Não deite fora este frasco.

23. Remova o Microseal B e coloque a placa no Magnetic Stand-96 durante 30 segundos, deixando as esferas agruparem-se nos poços junto ao íman.

24. Utilizando uma pipeta configurada para 100 µL, aspire e elimine o sobrenadante da Tagmentation Wash final.

25. Retire a placa do suporte magnético.

26. Adicione 40 µL da mistura de PCR master a cada poço.

27. Sele a placa com o Microseal B.

28. Utilize o agitador de placa para misturar a 1800 rpm durante 2 minutos à temperatura ambiente.

29. Centrifugue a placa a 100 x g durante 10 segundos para garantir que todas as esferas são suspensas na mistura de PCR master.

#### Para tubos de índice (T),

30. (T) Homogeneíze por vórtice e centrifugue os tubos de índice para garantir que todo o volume se encontra no fundo do tubo.
31. (T) Retire o Microseal B da placa de amostra.
32. (T) Adicione 5 µL do índice i7 a cada poço, de acordo com o esquema de placa da folha 1.0 Sample\_Prep.
33. (T) Adicione 5 µL do índice i5 a cada poço, de acordo com o esquema de placa da folha 1.0 Sample\_Prep. Retome o passo 34.

#### Para placa de índice (P),

30. (P) Utilize um agitador de placa para misturar a placa de índice a 1800 rpm durante 1 minuto.
31. (P) Centrifugue a placa de índice a 100 x g durante 10 segundos para garantir que todo o volume se encontra no fundo do poço.
32. (P) Retire o Microseal B da placa de amostra.
33. (P) **Confirme a orientação correta da placa e o conjunto de índice correto. Não remova o vedante de película.** Perfure o vedante de película da placa de índice com uma ponta. Com uma nova ponta, transfira 10 µL dos índices combinados da placa de índice para cada poço de amostra, de acordo com o esquema de placa da folha 1.0 Sample\_Prep. Retome o passo 34.
34. Sele com um novo Microseal B.
35. Utilize o agitador de placa para misturar a 1800 rpm durante 1 minuto à temperatura ambiente.
36. Centrifugue a placa a 100 x g durante 10 segundos para recolher todos os reagentes no fundo do poço. Inspeccione visualmente para garantir que as esferas continuam distribuídas de forma homogénea na solução. Se as esferas não estiverem distribuídas de forma homogénea, repita a agitação de acordo com o passo 35.
37. Coloque a placa no termociclador, execute o programa de PCR de indexação utilizando a tampa aquecida a 105 °C e um volume de reação de 50 µL:

#	Passo	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
1	Preenchimento de intervalo	72°C	3 minutos	1
2	Desnaturação inicial	98°C	3 minutos	1
3	Desnaturação	98°C	20 segundos	9
4	Hibridação	60°C	30 segundos	
5	Extensão	72°C	3 minutos	
6	Extensão final	72°C	3 minutos	1
7	Fixação final	10°C	Fixação	1

**NOTA:** Ponto de paragem segura. As bibliotecas podem ser armazenadas a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 1 semana, no máximo.

**NOTA:** se avançar imediatamente para a seleção de tamanho e purificação, assegure de que as Purification Beads são colocadas à temperatura ambiente antes da utilização.

## 2.3 Seleção de tamanho e purificação

1. Para um rendimento e uma seleção de tamanho ideais, o volume da amostra, das esferas e do sobrenadante varia de acordo com o tamanho da execução. A tabela abaixo indica os volumes testados para o intervalo especificado de amostras por execução.

Volumes de reagentes para cálculos	6 - 24 Amostras/pool	25 - 48 amostras/pool	49 - 96 amostras/pool
N.º de amostras a serem agrupadas (máx. listado para intervalos)	24	48	96
Volume de biblioteca a ser agrupado por amostra (µL)	10	5	2.5
Volume de esferas diluídas por amostra (µL)	50	25	12.5
Volume de transferência de sobrenadante por amostra (µL)	55	27.5	13.75
Volume de esferas simples por amostra, passo 8 (µL)	4.4	2.2	1.1

2. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por amostra (µL)	Preparação necessária
Purification Beads (Purification Beads – 1 para kits de 96 testes)	2 °C a 8 °C CAIXA 5	24.7	Coloque à temperatura ambiente durante, pelo menos, 30 minutos. <b>Armazene novamente após a utilização para os passos subsequentes.</b>
Água esterilizada	15°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	Variado	Nenhuma preparação necessária.
Etanol 100%	15°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	1920	Prepare etanol 80%, conforme descrito abaixo.
Resuspension Buffer	2°C a 8°C CAIXA 5	Variado	Coloque à temperatura ambiente. <b>Armazene novamente após a utilização para os passos subsequentes.</b>

3. Prepare as Purification Beads diluídas com Purification Beads e água esterilizada utilizando os volumes calculados no *Livro de trabalho de pooling precoce CE IVD IFU095-5\_AlloSeq Tx*. Certifique-se de que as Purification Beads foram bem homogeneizadas por vórtice antes de as utilizar.
4. Prepare 2400 µL de etanol 80% fresco por pool, suficiente para 2 lavagens, utilizando 1920 µL de etanol 100% e 480 µL de água esterilizada.

**NOTA:** o número de pools por experiência está predefinido para 1 na célula amarela no passo 3 no livro de trabalho. Este pode ser substituído manualmente, se necessário. A alteração desta célula irá atualizar o número de pools para os passos subsequentes deste protocolo/livro de trabalho. Caso sejam executados mais do que 1 pool nesta experiência com o mesmo número de amostras por pool, o volume das Purification Beads deve ser aumentado em conformidade (isto é, duplicado para dois pools) e as instruções abaixo devem ser seguidas na íntegra para cada pool.

Caso sejam necessários diversos pools com diferentes números de amostras, este separador do livro de trabalho deve ser duplicado e as células a amarelo devem ser atualizadas para refletir o número de amostras, de modo que os volumes de reagente necessários/transferidos sejam corretamente ajustados. Para duplicar o separador, clique com o botão direito do rato em qualquer um dos separadores e selecione “Mover ou copiar”, selecione “3.0 SS\_Purification” na lista, marque a caixa “Criar cópia” e clique em “OK”.

5. Homogeneíze por vórtice e centrifugue todos os reagentes antes de utilizar.
6. Reúna tubos de 1,5 ml (**Opcional:** podem utilizar-se tubos de 2 ml, se preferido, aumentando o volume de lavagem de etanol de 1200 µL para 1500 µL no passo 20a abaixo).

**NOTA:** o processo demora aproximadamente 1 hora.

7. Distribua uma alíquota do volume apropriado (veja a tabela de cálculos acima ou o livro de trabalho) de Purification Beads diluídas no tubo de 1,5 mL.
8. Efetue a pipetagem das Tagmentation Beads e sobrenadante do PCR de indexação **ou** agite a placa do PCR de indexação durante 1 minuto a 1800 rpm e, em seguida, adicione o volume apropriado de cada amostra (veja a tabela de cálculos acima ou o livro de trabalho) ao tubo que contém as Purification Beads diluídas.
9. Homogeneíze por vórtice cada tubo a alta velocidade durante 10 segundos, até as amostras parecerem homogêneas por inspeção visual.
10. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos. Durante esta incubação, os fragmentos maiores unem-se às esferas.
11. Centrifugue rapidamente o tubo.
12. Coloque o tubo num suporte magnético durante 2,5 minutos, deixando as esferas agruparem-se junto ao íman. Se o sobrenadante permanecer turvo, mantenha-o no íman até ficar transparente.
13. **Transfira** o volume apropriado (veja a tabela de cálculos acima ou o livro de trabalho) do sobrenadante para um tubo novo.
14. Adicione o volume apropriado (veja a tabela de cálculos acima ou o livro de trabalho) de Purification Beads (não diluídas) ao tubo que contém o sobrenadante.
15. Homogeneíze por vórtice cada tubo a alta velocidade durante 10 segundos.
16. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos. Durante esta incubação, os fragmentos de tamanho-alvo unem-se às esferas.
17. Centrifugue rapidamente o tubo.
18. Coloque o tubo num suporte magnético durante 2,5 minutos, deixando as esferas agruparem-se junto ao íman. Se o sobrenadante permanecer turvo, mantenha-o no íman até ficar transparente.
19. Utilizando uma pipeta, aspire e elimine o sobrenadante, deixando as esferas no tubo junto ao íman.
20. Mantendo o tubo no íman, lave duas vezes com etanol 80%:
  - a) Adicione 1200 µL de etanol 80% a cada tubo,
  - b) Incube à temperatura ambiente durante 30 segundos,
  - c) Utilizando uma pipeta, aspire e elimine todo o sobrenadante,
  - d) Repita os passos a) a c) num total de 2 lavagens.
21. Remova todo o sobrenadante restante com uma pipeta P20.
22. Seque o tubo ao ar durante 5 minutos à temperatura ambiente para permitir que os restos de etanol se evaporem.
23. Retire o tubo do íman e adicione 37 µL de Resuspension Buffer a cada tubo para eluir os fragmentos-alvo.
24. Homogeneíze por vórtice cada tubo a alta velocidade durante 10 segundos.
25. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.
26. Centrifugue rapidamente o tubo.
27. Coloque o tubo num suporte magnético durante 30 segundos, deixando as esferas agruparem-se no tubo junto ao íman.
28. **Transfira** 35 µL de sobrenadante para um novo tubo de 1,5 ml para armazenamento. Este pool pode prosseguir para hibridação.

**NOTA:** Ponto de paragem segura. As bibliotecas podem ser armazenadas a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 1 mês, no máximo.

## 2.4 Quantificação Qubit (opcional)

1. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por pool (µL)	Preparação necessária
Tampão Qubit BR	-25°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	199	Nenhuma preparação necessária.
Corante Qubit BR	-25°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	1	Nenhuma preparação necessária.
Padrão BR #1	2°C a 8°C Fornecido pelo utilizador	10	Coloque à temperatura ambiente.
Padrão BR #2	2°C a 8°C Fornecido pelo utilizador	10	Coloque à temperatura ambiente.

- Reúna os tubos Qubit e o tubo de 1,5 ml ou 5 ml necessários para a preparação da solução de trabalho, dependendo do volume necessário.
- Prepare dois tubos de ensaio para os padrões e um para cada pool.
- Prepare a solução de trabalho Qubit de 200 µL utilizando 199 µL de tampão Qubit e 1 µL de corante Qubit por pool/padrão a ser quantificado.
- Homogeneíze por vórtice a solução de trabalho durante 2-3 segundos e, em seguida, centrifugue.
- Alíquota **190 µL** de solução de trabalho por cada tubo padrão.
- Alíquota **198 µL** de solução de trabalho por cada tubo de pool.
- Alíquota **10 µL** de solução padrão por cada tubo padrão respetivo.
- Alíquota **2 µL** de cada pool pelo respetivo tubo.
- Homogeneíze por vórtice todos os tubos durante 2-3 segundos e, em seguida, centrifugue.
- Incube os tubos durante 2 minutos à temperatura ambiente.
- Insira os tubos no Fluorómetro Qubit e efetue as leituras (consulte o protocolo do fabricante Qubit para obter mais informações).
- Registe as leituras Qubit na tabela do livro de trabalho para calcular a média por pool.

**NOTA:** o rendimento esperado da biblioteca é de, aproximadamente, 30-100 ng/µL, mas pode variar, dependendo da qualidade do ADN e da introdução. Deve ser obtido um rendimento de 10 ng/µL ou superior para garantir resultados de enriquecimento satisfatórios.

## 2.5 Visualização TapeStation (opcional)

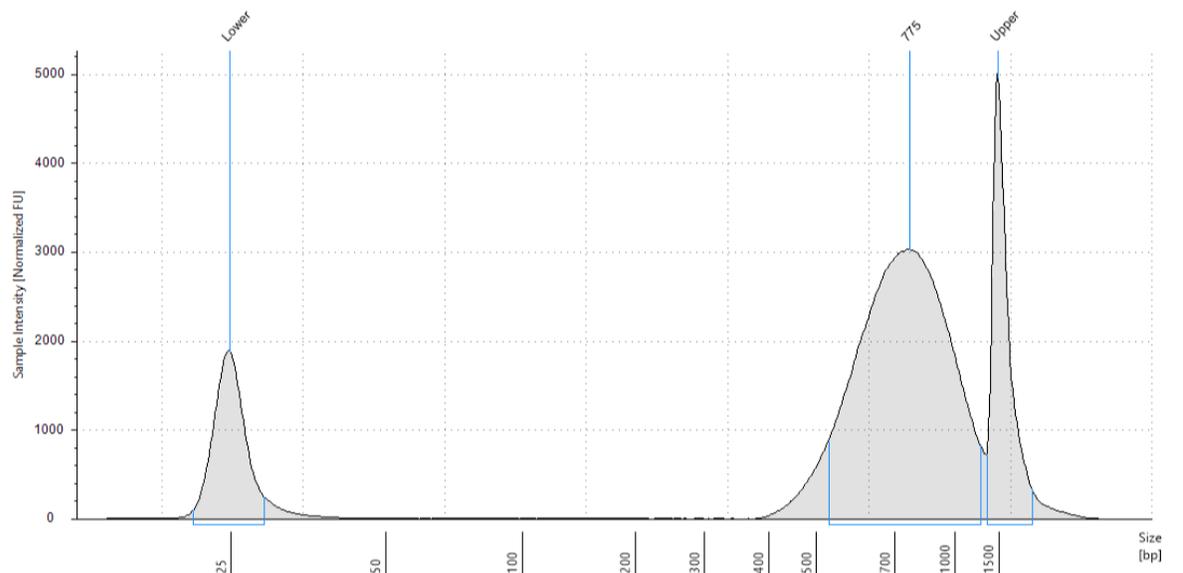
**NOTA:** mediante uma validação do utilizador, podem ser utilizados sistemas alternativos para visualização de fragmento, tais como o Fragment Analyzer, o Bioanalyzer ou semelhantes.

- Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por amostra (µL)	Preparação necessária
D1000 Ladder	2°C a 8°C Fornecido pelo utilizador	1	Coloque à temperatura ambiente.
D1000 Sample Buffer	2°C a 8°C Fornecido pelo utilizador	3	Coloque à temperatura ambiente.

- Reúna o ScreenTape D1000 necessário, as tampas e as faixas óticas de tubo TapeStation.
- Transfira 1 µL de cada amostra para um novo tubo.

4. Adicione 1 µL de D1000 Ladder a um tubo de referência.
5. Adicione 3 µL de tampão de amostra D1000 a cada poço de amostra e tubo de referência.
6. Sele todos os tubos com tampas.
7. Homogeneíze por vórtice com uma placa IKA a 2000 rpm durante 1 minuto.
8. Centrifugue durante breves instantes para garantir que todas as amostras se encontram no fundo dos tubos.
9. Destape e carregue os tubos de amostra no instrumento 2200 TapeStation.
10. Selecione os tubos necessários no 2200 TapeStation Controller Software e execute as amostras (consulte o manual do utilizador do TapeStation para obter mais informações).
11. Quando a execução estiver concluída, inicie o TapeStation Analysis Software para ver os resultados (consulte o manual do utilizador do TapeStation para obter mais informações).
12. Registe os resultados no livro de trabalho.



**Figura 2.5.1:** Imagem representativa do traço TapeStation para bibliotecas.

## 3. Captura híbrida (fluxo de trabalho Pooling precoce)

### 3.0 Introdução ao protocolo

- Siga o protocolo AlloSeq Tx abaixo pela ordem indicada utilizando os parâmetros especificados.
- Antes de continuar, confirme os conteúdos do kit e certifique-se de que está presente o equipamento e os consumíveis necessários.
- Para maior facilidade de utilização, os passos do protocolo para a captura híbrida também são descritos detalhadamente no *Livro de trabalho de pooling precoce CE IVD IFU095-5\_AlloSeq Tx*. As referências ao livro de trabalho constantes no Capítulo 3 dizem respeito a este livro de trabalho.

### 3.1 Hibridação de sonda

1. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por pool (µL)	Preparação necessária
AlloSeq Tx Probe Panel	-15 °C a -25 °C CAIXA 4	10	Coloque à temperatura ambiente.
Hybridisation Buffer 1	-15 °C a -25 °C CAIXA 4	50	Coloque em Hybex a 58 °C durante 15 minutos. Homogeneíze por vórtice e inspecione visualmente. Se restar precipitado, incube a 58 °C durante 15 minutos adicionais.
Hybridisation Buffer 2	2°C a 8°C CAIXA 5	10	Coloque à temperatura ambiente.

- Homogeneíze por vórtice e centrifugue todos os reagentes antes de utilizar.
- Reúna os tubos/faixas de PCR e tampas necessários.

**NOTA:** não existe um ponto de paragem segura antes do protocolo de captura. Os pools de amostra têm de avançar imediatamente após o passo de fixação de 62 °C da reação de termociclagem de hibridação para os passos de captura de esfera e lavagem aquecida.

**NOTA:** a configuração deste processo demora aproximadamente 20 minutos e, no mínimo, 1,5 horas e, no máximo, 18 horas no termociclador (reações deixadas de um dia para o outro ou até 18 horas têm de ser mantidas a uma temperatura de 62 °C no passo de fixação final de reação).

- Para cada reação de hibridação, combine os seguintes reagentes pela ordem indicada abaixo num tubo/faixa de PCR:

Reagente	Volume por pool (µL)
Pool de bibliotecas de amostra	30
AlloSeq Tx Probe Panel	10
Hybridisation Buffer 1	50
Hybridisation Buffer 2	10
<b>Total</b>	<b>100</b>

- Com uma pipeta configurada para 70 µL, efetue a pipetagem da mistura de cada poço de reação de hibridação 10 vezes, sele e, em seguida, centrifugue.
- Se a solução continuar turva, efetue a pipetagem da mistura mais 6-8 vezes, sele e, em seguida, centrifugue.
- Coloque o tubo/faixa no termociclador e execute o programa de hibridação utilizando a tampa aquecida a **100 °C** e um volume de reação de 100 µL:

#	Passo	Temperatura	Tempo	N.º de ciclos
1	Desnaturação	98°C	5 minutos	1
2	Redução gradual	98 °C - 62 °C, reduzindo 2 °C/ciclo	1 minuto	1
3	Avance para o passo 2 durante 18 ciclos adicionais (total de 19 ciclos) reduzindo 2 °C/ciclo.			
4	Hibridação	62°C	<b>60 minutos</b>	1
5	Fixação final	62°C	Fixação (não ultrapassar 18 horas a 62 °C, incluindo no passo n.º 4)	1

- Deixe o tubo/faixa no termociclador até estar pronto para avançar para a captura. Assegure-se de que as esferas de captura atingiram a temperatura ambiente e que o Capture Wash Buffer e o Hybex são aquecidos a 58 °C.

## 3.2 Captura

1. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por pool (µL)	Preparação necessária
Capture Beads	2°C a 8°C CAIXA 5	250	Coloque à temperatura ambiente durante, pelo menos, 30 minutos.
Capture Wash Buffer	-15 °C a -25 °C CAIXA 4	800	Pré-aqueça a 58 °C antes de utilizar.
Capture Elution Buffer 1	-15 °C a -25 °C CAIXA 4	28.5	Coloque à temperatura ambiente.
2N NaOH	-15 °C a -25 °C CAIXA 4	1.5	Coloque à temperatura ambiente. Armazene novamente após a utilização para os passos subsequentes.
Capture Elution Buffer 2	2°C a 8°C CAIXA 5	4	Coloque à temperatura ambiente.

2. Prepare uma mistura de eluição master dos seguintes reagentes por pool a ser capturado:

Reagente	Volume por pool (µL)
Capture Elution Buffer 1	28.5
2N NaOH (fresco)	1,5

**NOTA:** a solução de NaOH absorve rapidamente o CO<sub>2</sub> da atmosfera, alterando o pH e o desempenho do reagente. Assegure-se de que o tubo de 2N NaOH está fechado quando não está a ser utilizado.

- Homogeneíze por vórtice e centrifugue todos os reagentes antes de utilizar.
- Reúna os tubos de microcentrifugação de 1,5 ml, tubos/faixas de PCR e tampas necessários.

**NOTA:** este processo demora aproximadamente 1 hora.

- Para cada reação de hibridação, adicione 250 µL de Capture Beads a um tubo novo de 1,5 mL.
- Transfira** 100 µL de cada reação de hibridação para o tubo respetivo com Capture Beads.
- Homogeneíze por vórtice o tubo a alta velocidade durante 10 segundos. Não centrifugue.
- Incube o tubo no Hybex a 58 °C durante 15 minutos.
- Centrifugue rapidamente o tubo.
- Coloque imediatamente o tubo num suporte magnético durante 30 segundos, deixando as esferas agruparem-se junto ao íman.
- Utilizando uma pipeta, aspire e elimine o sobrenadante, deixando as esferas no tubo junto ao íman.
- Lave três vezes com Capture Wash Buffer aquecido, conforme descrito abaixo:

**NOTA:** quando não estiver a ser utilizado, mantenha o Capture Wash Buffer no Hybex para manter uma temperatura de 58 °C. Apenas retire do Hybex imediatamente antes de adicionar à reação no passo 12b e 14. Trabalhe com rapidez quando realizar os passos de lavagem aquecida para minimizar o tempo durante o qual o pool/tampão da amostra permanece à temperatura ambiente.

- Retire o tubo do íman,
- Adicione 200 µL de Capture Wash Buffer (58 °C),
- Homogeneíze por vórtice o tubo a alta velocidade durante 10 segundos. Não centrifugue.
- Incube o tubo no Hybex a 58 °C durante 5 minutos.
- Centrifugue e coloque imediatamente o tubo num suporte magnético durante 30 segundos, deixando as esferas agruparem-se junto ao íman.
- Utilizando uma pipeta, aspire e elimine o sobrenadante, deixando as esferas no tubo junto ao íman.
- Repita os passos a) a f) mais duas vezes, num total de 3 lavagens.

13. Retire o tubo do íman.
14. Adicione 200 µL de Capture Wash Buffer aquecido (58 °C).
15. Homogeneíze por vórtice o tubo a alta velocidade durante 10 segundos. Não centrifugue.
16. **Transfira** todos os conteúdos (solução e esferas de lavagem) para um novo tubo de 1,5 mL.

**NOTA:** este passo de transferência é essencial para remover os inibidores de PCR que podem afetar o desempenho a jusante.

17. Incube o tubo no Hybex a 58 °C durante 5 minutos.
18. Centrifugue e coloque imediatamente o tubo num suporte magnético durante 30 segundos, deixando as esferas agruparem-se junto ao íman.
19. Utilizando uma pipeta, aspire e elimine o sobrenadante, deixando as esferas no tubo junto ao íman.
20. Centrifugue de forma rápida e coloque imediatamente o tubo num suporte magnético durante 30 segundos, deixando as esferas agruparem-se junto ao íman.
21. Utilizando uma pipeta P20, aspire e elimine o sobrenadante restante, deixando as esferas no tubo junto ao íman.
22. Homogeneíze por vórtice a mistura de eluição master preparada anteriormente e, em seguida, retire o tubo de reação do íman e adicione 23 µL de mistura de eluição master a cada tubo.
23. Homogeneíze por vórtice o tubo a alta velocidade durante 10 segundos.
24. Incube à temperatura ambiente durante 2 minutos.
25. Centrifugue rapidamente o tubo.
26. Coloque o tubo num suporte magnético durante 30 segundos, deixando as esferas agruparem-se junto ao íman.
27. **Transfira** 21 µL de sobrenadante para um novo tubo/faixa de PCR.
28. Adicione 4 µL de Capture Elution Buffer 2.
29. Efetue a pipetagem da mistura 6-8 vezes. O volume final é de 25 µL.

**NOTA:** Ponto de paragem segura. As bibliotecas podem ser armazenadas a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 24 horas, no máximo.

### 3.3 PCR de pós-enriquecimento

1. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por pool (µL)	Preparação necessária
PCR Primers	-15 °C a -25 °C CAIXA 4	5	Descongele em gelo. Inverta para misturar e, em seguida, centrifugue durante breves instantes.
PCR Mix (ou PCR Mix-2 para kits de 96 testes)	-15 °C a -25 °C CAIXA 4	20	Descongele à temperatura ambiente e, em seguida, coloque em gelo.

2. Homogeneíze por vórtice e centrifugue todos os reagentes antes de utilizar.
3. Reúna os tubos de PCR necessários com bibliotecas de captura do passo 3.2 Captura.

**NOTA:** este processo demora aproximadamente 5 minutos a configurar, **1:40** horas no termociclador.

4. Adicione 5 µL de PCR Primers às bibliotecas capturadas no tubo de PCR.
5. Adicione 20 µL de PCR Mix ao tubo.
6. Efetue a pipetagem da mistura 10 vezes.
7. Centrifugue rapidamente o tubo.
8. Coloque o tubo/faixa no termociclador e execute o programa de PCR de pós-enriquecimento utilizando a tampa aquecida a 105 °C e um volume de reação de 50 µL:

#	Passo	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
1	Desnaturação	98°C	30 segundos	1
2	Desnaturação	98°C	1 minuto	17
3	Hibridação	60°C	30 segundos	
4	Extensão	72°C	3 minutos	
5	Extensão final	72°C	5 minutos	1
6	Fixação final	10°C	Fixação	1

**NOTA:** Ponto de paragem segura. As bibliotecas podem ser armazenadas a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 1 semana, no máximo.

**NOTA:** se avançar imediatamente para a purificação, assegure-se de que as Purification Beads são colocadas à temperatura ambiente antes da utilização.

### 3.4 Purificação do PCR de pós-enriquecimento

1. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por pool (µL)	Preparação necessária
Purification Beads (Purification Beads-2 para kit de 96)	2 °C a 8 °C CAIXA 5	27	Coloque à temperatura ambiente durante, pelo menos, 30 minutos.
Água esterilizada	15°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	80	Nenhuma preparação necessária.
Etanol 100%	15°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	320	Prepare etanol 80%, conforme descrito abaixo.
Resuspension Buffer	2°C a 8°C CAIXA 5	32	Coloque à temperatura ambiente. <b>Armazene novamente após a utilização para os passos subsequentes.</b>

2. Prepare 80% de etanol fresco (2 lavagens por pool) utilizando 480 µL de etanol 100% e 120 µL de água esterilizada (inclui um volume em excesso).
3. Homogeneíze por vórtice e centrifugue todos os reagentes antes de utilizar.
4. Reúna os tubos de microcentrifugação de 1,5 ml necessários.

**NOTA:** o processo demora aproximadamente **30** minutos.

5. Para cada reação de purificação, adicione 27 µL de Purification Beads bem homogeneizadas por vórtice a um tubo novo de 1,5 ml.
6. **Transfira** 45 µL de cada reação de PCR de pós-enriquecimento para o tubo respetivo com Purification Beads.
7. Homogeneíze por vórtice cada tubo a alta velocidade durante 10 segundos.
8. Centrifugue rapidamente o tubo.
9. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.
10. Coloque o tubo num suporte magnético durante 30 segundos, deixando as esferas agruparem-se junto ao íman.
11. Utilizando uma pipeta, aspire e elimine o sobrenadante, deixando as esferas no tubo junto ao íman.
12. Mantendo o tubo no íman, lave duas vezes com etanol 80%:
  - a) Adicione 200 µL de etanol 80% a cada tubo,
  - b) Incube à temperatura ambiente durante 30 segundos,
  - c) Utilizando uma pipeta, aspire e elimine todo o sobrenadante,
  - d) Repita os passos a) a c) num total de 2 lavagens.
13. Remova todo o sobrenadante restante com uma pipeta P20.

14. Seque o tubo ao ar durante 5 minutos à temperatura ambiente para permitir que os restos de etanol se evaporem.
15. Retire o tubo do íman e adicione 32 µL de Resuspension Buffer a cada tubo para eluir os fragmentos-alvo.
16. Homogeneíze por vórtice cada tubo a alta velocidade durante 10 segundos.
17. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.
18. Centrifugue rapidamente o tubo.
19. Coloque o tubo num suporte magnético durante 30 segundos, deixando as esferas agruparem-se no tubo junto ao íman.
20. **Transfira** 30 µL de sobrenadante para um novo tubo de 1,5 ml, para armazenamento.

**NOTA:** Ponto de paragem segura. As bibliotecas podem ser armazenadas a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 1 mês, no máximo.

### 3.5 Quantificação Qubit

1. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por pool (µL)	Preparação necessária
Tampão Qubit BR	-25°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	199	Nenhuma preparação necessária.
Corante Qubit BR	-25°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	1	Nenhuma preparação necessária.
Padrão BR #1	2°C a 8°C Fornecido pelo utilizador	10	Coloque à temperatura ambiente.
Padrão BR #2	2°C a 8°C Fornecido pelo utilizador	10	Coloque à temperatura ambiente.

2. Reúna os tubos Qubit e o tubo de 1,5 ml ou 5 ml necessários para a preparação da solução de trabalho, dependendo do volume necessário.
3. Prepare dois tubos de ensaio para os padrões e um para cada pool.
4. Prepare a solução de trabalho Qubit de 200 µL utilizando 199 µL de tampão Qubit e 1 µL de corante Qubit por pool/padrão a ser quantificado.
5. Homogeneíze por vórtice a solução de trabalho durante 2-3 segundos e, em seguida, centrifugue.
6. Alíquota **190 µL** de solução de trabalho por cada tubo padrão.
7. Alíquota **198 µL** de solução de trabalho por cada tubo de pool.
8. Alíquota **10 µL** de solução padrão por cada tubo padrão respetivo.
9. Alíquota **2 µL** de cada pool pelo respetivo tubo.
10. Homogeneíze por vórtice todos os tubos durante 2-3 segundos e, em seguida, centrifugue.
11. Incube os tubos durante 2 minutos à temperatura ambiente.
12. Insira os tubos no Fluorómetro Qubit e efetue as leituras (consulte o protocolo do fabricante Qubit para obter mais informações).
13. Registe as leituras Qubit na tabela do livro de trabalho para calcular a concentração média.

### 3.6 Visualização TapeStation (opcional)

**NOTA:** mediante uma validação do utilizador, podem ser utilizados sistemas alternativos para visualização de fragmento, tais como o Fragment Analyzer, o Bioanalyzer ou semelhantes.

1. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por pool (µL)	Preparação necessária
D1000 Ladder	2°C a 8°C Fornecido pelo utilizador	1	Coloque à temperatura ambiente.
D1000 Sample Buffer	2°C a 8°C Fornecido pelo utilizador	3	Coloque à temperatura ambiente.

2. Reúna o ScreenTape D1000 necessário, as tampas e as faixas óticas de tubo TapeStation.
3. Transfira 1 µL de cada pool para um novo tubo.
4. Adicione 1 µL de D1000 Ladder a um tubo de referência.
5. Adicione 3 µL de tampão de amostra D1000 a cada pool e tubo de referência.
6. Sele todos os tubos com tampas.
7. Homogeneíze por vórtice todos os tubos utilizando uma placa IKA para homogeneizar por vórtice a 2000 rpm durante 1 minuto.
8. Centrifugue durante breves instantes para garantir que todas as amostras se encontram no fundo dos tubos.
9. Destape e carregue os tubos de amostra no instrumento 2200 TapeStation.
10. Selecione os tubos necessários no 2200 TapeStation Controller Software e execute as amostras (consulte o manual do utilizador do TapeStation para obter mais informações).
11. Quando a execução estiver concluída, inicie o TapeStation Analysis Software para ver os resultados (consulte o manual do utilizador do TapeStation para obter mais informações).
12. Registe as leituras na tabela do livro de trabalho.

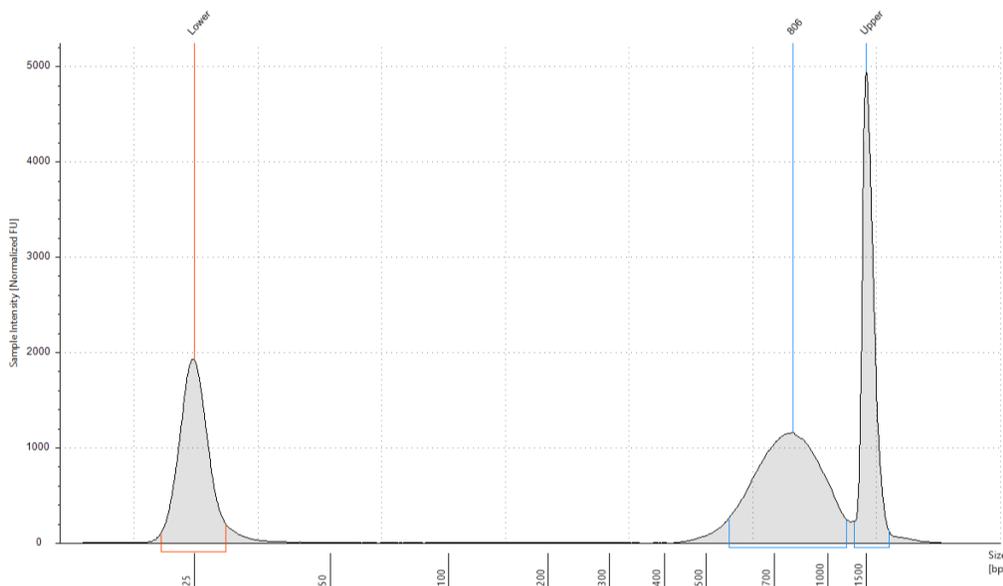


Figura 3.6.1: Imagem representativa do traço TapeStation para pool de biblioteca enriquecida final.

## 4. Preparação de biblioteca (fluxo de trabalho Original)

### 4.0 Introdução ao protocolo

- Siga o protocolo AlloSeq Tx abaixo pela ordem indicada utilizando os parâmetros especificados.
- Antes de continuar, confirme os conteúdos do kit e certifique-se de que está presente o equipamento e os consumíveis necessários.

- Para maior facilidade de utilização, os passos do protocolo para a Preparação de biblioteca também são descritos detalhadamente no *Livro de trabalho de preparação de biblioteca CE IVD IFU095-1\_AlloSeq Tx*. As referências ao livro de trabalho constantes no Capítulo 4 dizem respeito a este livro de trabalho.

## 4.1 Preparação da amostra

1. Introduza um ID de experiência, descrição, operador e data no livro de trabalho.
2. Selecione o conjunto de sonda AlloSeq a ser utilizado na experiência a partir do menu pendente do livro de trabalho.
3. Selecione o tipo de sequenciador a ser utilizado a partir do menu pendente do livro de trabalho.
4. Introduza o ID das amostras a serem testadas na secção amarela do modelo de placa no livro de trabalho, de acordo com a configuração pretendida.

**NOTA:** só podem ser introduzidos caracteres alfanuméricos. Os IDs de amostra duplicados serão assinalados a vermelho para serem corrigidos pelo utilizador. O software do sequenciador exige que haja apenas um ID de amostra por execução. Não introduza qualquer informação para poços que não irão conter qualquer amostra.

5. Selecione o conjunto de índice pretendido na lista pendente laranja por baixo do esquema de placa.
6. Se for necessário e estiver a utilizar o formato de índice tubular, a ordem do índice i7 pode ser alterada; selecione o índice i7 alternativo a ser utilizado a partir das opções da lista pendente para a coluna necessária. Caso sejam selecionados índices i7 duplicados, as células serão assinaladas a vermelho para serem corrigidas pelo utilizador.
7. Se for necessário e estiver a utilizar o formato de índice tubular, a ordem do índice i5 pode ser alterada; selecione o índice i5 a ser utilizado a partir das opções da lista pendente para a linha necessária. Caso sejam selecionados índices i5 duplicados, as células serão assinaladas a vermelho para serem corrigidas pelo utilizador.
8. Uma vez completadas todas as ações acima, clique no separador 1.2 SampleSheet e reveja. Será utilizado texto a vermelho para assinalar os locais onde ainda é necessário introduzir informação. Se não for apresentado texto a vermelho, o separador SampleSheet pode ser guardado como CSV (delimitado por vírgulas) (\*.csv). Guarde o ficheiro como "SampleSheet.csv". No formato CSV, só o separador ativo é guardado. Abra o ficheiro SampleSheet.csv guardado no Excel e elimine quaisquer linhas vazias na tabela [Dados], ou seja, quaisquer linhas entre 22 e 117 que não incluam informação da amostra. Após fazer isto, guarde o ficheiro. A Ficha de dados da amostra está pronta para ser importada para o sequenciador Illumina.

## 4.2 Preparação da biblioteca

1. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por amostra (µL)	Preparação necessária
Tagmentation Buffer	-15 °C a -25 °C CAIXA 1	10	Coloque à temperatura ambiente.
Água esterilizada	15°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	30	Nenhuma preparação necessária.
Tagmentation Beads	-15 °C a -25 °C CAIXA 1	10	<b>Coloque à temperatura ambiente durante, pelo menos, 30 minutos.</b>
Stop Buffer	15°C a 30°C CAIXA 2	10	Nenhuma preparação necessária.

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por amostra (µL)	Preparação necessária
Tagmentation Wash Buffer	15°C a 30°C CAIXA 2	300	Nenhuma preparação necessária.
PCR Mix (ou PCR Mix-1 para kits de 96)	-15 °C a -25 °C CAIXA 4 (ou CAIXA 1 para kit de 96)	20	Descongele e mantenha em gelo. <b>Armazene novamente após a utilização para os passos subsequentes.</b>
Índices: <b>ASTX17.1(24)-IVD:</b> H503, H505, H506, H517, H705, H706, H707, H710, H711, H714 <b>ASTX17.1(24)-B-IVD:</b> H502, H507, H508, H521, H701, H702, H703, H704, H712, H715 <b>ASTX17.1(96)-A-IVD/ASTX9.1(96)-A-IVD:</b> H503, H505, H506, H517, H502, H507, H508, H521, H705, H706, H707, H710, H711, H714, H701, H702, H703, H704, H712, H715 <b>ASTX17.1(96)-B-IVD/ASTX9.1(96)-B-IVD:</b> 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 CAIXA 3	Total de 10	Descongele e mantenha em gelo.

- Homogeneíze por vórtice e centrifugue todos os reagentes antes de utilizar.
- Reúna a placa de 96 poços, o Microseal B e os tubos de microcentrifugação de 1,5 ml.

**NOTA:** não existe um ponto de paragem segura até ao PCR de indexação. O processo demora aproximadamente **1:50** horas (incluindo 50 min. de termociclagem de PCR).

- Para cada amostra de ADN, distribua uma alíquota de 10 µL da amostra de 10-100 ng/µL no poço apropriado de uma placa PCR de acordo com o modelo de placa da folha 1.0 Sample\_Prep.
- Prepare uma mistura master de tagmentação de 40 µL por amostra utilizando 10 µL de Tagmentation Buffer, 20 µL de água esterilizada e 10 µL de Tagmentation Beads.
- Prepare a mistura master com um vórtice e, em seguida, centrifugue.
- Efetue a pipetagem de 40 µL de mistura master de tagmentação em cada poço com uma amostra de ADN.
- Sele a placa com o Microseal B.
- Centrifugue a placa a 100 x g durante 10 segundos para recolher todos os reagentes no fundo do poço.
- Utilize o agitador de placa para misturar a 1600 rpm durante 1 minuto.
- Inspeccione visualmente a placa:
  - Se as esferas não estiverem distribuídas de forma homogénea no poço, repita a agitação de acordo com o passo 10.
  - Se o material não estiver no fundo do poço ou tiver salpicado para o Microseal B, centrifugue e repita a agitação de acordo com o passo 10.
- Coloque a placa no termociclador e execute o programa de tagmentação utilizando a tampa aquecida a 105 °C e um volume de reação de 50 µL:

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

- Quando o programa terminar, retire imediatamente a placa do termociclador e deixe à temperatura ambiente durante 2 minutos.

14. Retire o Microseal B.
15. Adicione 10 µL de Stop Buffer a cada poço de reação.
16. Sele novamente a placa com um novo Microseal B.
17. Utilize o agitador de placa para misturar a 1600 rpm durante 1 minuto.
18. Incube a placa durante 5 minutos adicionais à temperatura ambiente.
19. Durante a incubação, retire o PCR Mix e os índices do congelador para descongelarem e, em seguida, coloque numa prateleira de gelo/fria.
20. Inspeção visualmente a placa e, se o material não estiver no fundo do poço ou tiver salpicado para o Microseal B, centrifugue a placa.
21. Lave três vezes com o Tagmentation Wash Buffer, conforme descrito abaixo:
  - a) Remova o Microseal B e coloque a placa no Magnetic Stand-96 durante 1 minuto, deixando as esferas agruparem-se nos poços junto ao íman.
  - b) Utilizando uma pipeta, aspire e elimine o sobrenadante, deixando as esferas nos poços junto ao íman.
  - c) Adicione lentamente 100 µL de Tagmentation Wash Buffer em cada poço.
  - d) Sele novamente a placa com um novo Microseal B. Assegure que o Microseal adere corretamente.
  - e) Utilize o agitador de placa para misturar a 1800 rpm durante 2 minutos à temperatura ambiente.
  - f) **CUIDADO:** Se as amostras tiverem salpicado para o vedante, centrifugue a 100 x g durante 10 segundos antes de remover o selo.
  - g) Repita os passos a) a f) mais duas vezes, num total de 3 lavagens.

**NOTA:** antes de eliminar o sobrenadante da terceira lavagem, prepare a mistura de PCR master conforme descrito abaixo.

22. Prepare uma mistura de PCR master de 40 µL utilizando 20 µL de água esterilizada e 20 µL de PCR Mix (ou PCR Mix-1 se utilizar kits de 96 testes).

**NOTA:** o PCR Mix é utilizado para os passos subsequentes no protocolo. Não deite fora este frasco.

23. Remova o Microseal B e coloque a placa no Magnetic Stand-96 durante 1 minuto, deixando as esferas agruparem-se nos poços junto ao íman.
24. Utilizando uma pipeta configurada para 100 µL, aspire e elimine o sobrenadante da Tagmentation Wash final.
25. Retire a placa do suporte magnético.
26. Adicione 40 µL da mistura de PCR master a cada poço.
27. Sele a placa com o Microseal B.
28. Utilize o agitador de placa para misturar a 1800 rpm durante 2 minutos à temperatura ambiente.
29. Centrifugue a placa a 100 x g durante 10 segundos para garantir que todas as esferas são suspensas na mistura de PCR master.

**Para tubos de índice (T),**

30. (T) Homogeneíze por vórtice e centrifugue os tubos de índice para garantir que todo o volume se encontra no fundo do tubo.
  31. (T) Retire o Microseal B da placa de amostra.
  32. (T) Adicione 5 µL do índice i7 a cada poço, de acordo com o esquema de placa da folha 1.0 Sample\_Prep.
  33. (T) Adicione 5 µL do índice i5 a cada poço, de acordo com o esquema de placa da folha 1.0 Sample\_Prep.
- Retome o passo 34.

**Para placa de índice (P),**

30. (P) Utilize um agitador de placa para misturar a placa de índice a 1800 rpm durante 1 minuto.
31. (P) Centrifugue a placa de índice a 100 x g durante 10 segundos para garantir que todo o volume se encontra no fundo do poço.
32. (P) Retire o Microseal B da placa de amostra.

33. (P) **Confirme a orientação correta da placa e o conjunto de índice correto. Não remova o vedante de película.** Perfure o vedante de película da placa de índice com uma ponta. Com uma nova ponta, transfira 10 µL dos índices combinados da placa de índice para cada poço de amostra, de acordo com o esquema de placa da folha 1.0 Sample\_Prep.

Retome o passo 34.

34. Sele com um novo Microseal B.
35. Utilize o agitador de placa para misturar a 1800 rpm durante 1 minuto à temperatura ambiente.
36. Centrifugue a placa a 100 x g durante 10 segundos para recolher todos os reagentes no fundo do poço. Inspeccione visualmente para garantir que as esferas continuam distribuídas de forma homogénea na solução. Se as esferas não estiverem distribuídas de forma homogénea, repita a agitação de acordo com o passo 35.
37. Coloque a placa no termociclador, execute o programa de PCR de indexação utilizando a tampa aquecida a 105 °C e um volume de reação de 50 µL:

#	Passo	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
1	Preenchimento de intervalo	72°C	3 minutos	1
2	Desnaturação inicial	98°C	3 minutos	1
3	Desnaturação	98°C	20 segundos	9
4	Hibridação	60°C	30 segundos	
5	Extensão	72°C	3 minutos	
6	Extensão final	72°C	3 minutos	1
7	Fixação final	10°C	Fixação	1

**NOTA:** Ponto de paragem segura. As bibliotecas podem ser armazenadas a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 1 semana, no máximo.

**NOTA:** se avançar imediatamente para a seleção de tamanho e purificação, assegure de que as Purification Beads são colocadas à temperatura ambiente antes da utilização.

### 4.3 Seleção de tamanho e purificação

1. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por amostra (µL)	Preparação necessária
Purification Beads (Purification Beads – 1 para kits de 96 testes)	2 °C a 8 °C CAIXA 5	110.8	Coloque à temperatura ambiente durante, pelo menos, 30 minutos. <b>Armazene novamente após a utilização para os passos subsequentes.</b>
Água esterilizada	15°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	215	Nenhuma preparação necessária.
Etanol 100%	15°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	320	Prepare etanol 80%, conforme descrito abaixo.
Resuspension Buffer	2°C a 8°C CAIXA 5	17	Coloque à temperatura ambiente. <b>Armazene novamente após a utilização para os passos subsequentes.</b>

2. Prepare as Purification Beads diluídas utilizando 90 µL de Purification Beads e 135 µL de água esterilizada, por amostra. Certifique-se de que as Purification Beads foram suficientemente agitadas antes de as utilizar.
3. Prepare 600 µL de etanol 80% fresco por amostra, suficiente para 2 lavagens, utilizando 480 µL de etanol 100% e 120 µL de água esterilizada (inclui volume em excesso).

4. Homogeneíze por vórtice e centrifugue todos os reagentes antes de utilizar.
5. Reúna a placa MIDI, o Microseal B e as placas de PCR.

**NOTA:** o processo demora aproximadamente 1 hora.

6. Alíquota 225 µL de Purification Beads diluídas nos poços apropriados de uma placa MIDI (de acordo com o modelo de placa da folha 1.0 Sample\_Prep).
7. Efetue a pipetagem da mistura de Tagmentation Beads e sobrenadante do PCR de indexação **ou** agite a placa do PCR de indexação durante 1 minuto a 1800 rpm e, em seguida, adicione 45 µL de cada mistura ao poço relevante da placa MIDI que contém as Purification Beads diluídas.
8. Sele a placa MIDI com o Microseal B.
9. Utilize o agitador de placa para misturar a 1800 rpm durante 2 minutos.
10. Incube a placa durante 5 minutos à temperatura ambiente. Durante esta incubação, os fragmentos maiores unem-se às esferas.
11. Centrifugue a placa a 280 x g durante 1 minuto.
12. Remova o Microseal B e coloque a placa no Magnetic Stand-96 durante 5 minutos, deixando as esferas agruparem-se nos poços junto ao íman.
13. **Transfira 260 µL do sobrenadante para uma nova placa MIDI ou poços limpos na mesma placa.**
14. Adicione 20,8 µL de Purification Beads (não diluídas) bem homogeneizadas por vórtice a cada amostra. Sele com o Microseal B.
15. Utilize o agitador de placa para misturar a 1800 rpm durante 1 minuto.
16. Incube a placa durante 5 minutos à temperatura ambiente. Durante esta incubação, os fragmentos de tamanho-alvo unem-se às esferas.
17. Remova o Microseal B e coloque a placa no Magnetic Stand-96 durante 5 minutos, deixando as esferas agruparem-se nos poços junto ao íman.
18. Utilizando uma pipeta, aspire e elimine o sobrenadante, deixando as esferas nos poços junto ao íman.
19. Mantendo a placa no íman, lave duas vezes com etanol 80%:
  - a) Adicione 200 µL de etanol 80% a cada amostra,
  - b) Incube à temperatura ambiente durante 30 segundos,
  - c) Utilizando uma pipeta, aspire e elimine todo o sobrenadante,
  - d) Repita os passos a) a c) num total de 2 lavagens.
20. Remova todo o sobrenadante restante com uma pipeta P20.
21. Seque a placa ao ar durante 5 minutos à temperatura ambiente para permitir que os restos de etanol se evaporem.
22. Adicione 17 µL de Resuspension Buffer a cada poço para eluir os fragmentos-alvo.
23. Sele o placa com o Microseal B.
24. Utilize o agitador de placa para misturar a 1800 rpm durante 2 minutos.
25. Incube a placa durante 5 minutos à temperatura ambiente.
26. Centrifugue a placa a 280 x g durante 30 segundos.
27. Remova o Microseal B e coloque a placa no Magnetic Stand-96 durante 5 minutos, deixando as esferas agruparem-se nos poços junto ao íman.
28. **Transfira 15 µL de sobrenadante para uma nova placa de PCR, para armazenamento.**

**NOTA:** Ponto de paragem segura. As bibliotecas podem ser armazenadas a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 1 mês, no máximo.

#### 4.4 Quantificação Qubit (opcional)

1. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por amostra (µL)	Preparação necessária
Tampão Qubit BR	-25°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	199	Nenhuma preparação necessária.
Corante Qubit BR	-25°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	1	Nenhuma preparação necessária.
Padrão BR #1	2°C a 8°C Fornecido pelo utilizador	10	Coloque à temperatura ambiente.
Padrão BR #2	2°C a 8°C Fornecido pelo utilizador	10	Coloque à temperatura ambiente.

- Reúna os tubos Qubit e o tubo de 1,5 ml ou 5 ml necessários para a preparação da solução de trabalho, dependendo do volume necessário.
- Prepare dois tubos de ensaio para os padrões e um para cada amostra.
- Prepare a solução de trabalho Qubit de 200 µL utilizando 199 µL de tampão Qubit e 1 µL de corante Qubit por amostra/padrão a ser quantificado.
- Homogeneíze por vórtice a solução de trabalho durante 2-3 segundos e, em seguida, centrifugue.
- Alíquota **190 µL** de solução de trabalho por cada tubo padrão.
- Alíquota **198 µL** de solução de trabalho por cada tubo de amostra.
- Alíquota **10 µL** de solução padrão por cada tubo padrão respetivo.
- Alíquota **2 µL** de cada amostra pelo respetivo tubo.
- Homogeneíze por vórtice todos os tubos durante 2-3 segundos e, em seguida, centrifugue.
- Incube os tubos durante 2 minutos à temperatura ambiente.
- Insira os tubos no Fluorómetro Qubit e efetue as leituras (consulte o protocolo Qubit para obter mais informações).
- Registe as leituras Qubit na tabela do livro de trabalho para calcular a média por amostra.

**NOTA:** o rendimento esperado da biblioteca é de aproximadamente 30 ng/µL, mas pode variar, dependendo da qualidade do ADN e da introdução. Deve ser obtido um rendimento de 10 ng/µL ou superior para garantir resultados de enriquecimento satisfatórios.

## 4.5 Visualização TapeStation (opcional)

**NOTA:** mediante uma validação do utilizador, podem ser utilizados sistemas alternativos para visualização de fragmento, tais como o Fragment Analyzer, o Bioanalyzer ou semelhantes.

- Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por amostra (µL)	Preparação necessária
D1000 Ladder	2°C a 8°C Fornecido pelo utilizador	1	Coloque à temperatura ambiente.
D1000 Sample Buffer	2°C a 8°C Fornecido pelo utilizador	3	Coloque à temperatura ambiente.

- Reúna o ScreenTape D1000 necessário, a placa de amostra de 96 poços (de paredes finas) e o vedante de película.
- Transfira 1 µL de cada amostra para uma nova placa de PCR de 96 poços.
- Adicione 1 µL de D1000 Ladder a um poço de referência.
- Adicione 3 µL de tampão de amostra D1000 a cada poço de amostra e poço de referência.
- Sele a placa com vedante de película.

7. Utilize a placa IKA para homogeneizar por vórtice a 2000 rpm durante 1 minuto.
8. Centrifugue durante breves instantes para garantir que todas as amostras se encontram no fundo dos poços.
9. Carregue a placa de amostra no instrumento 2200 TapeStation.
10. Selecione os poços necessários no 2200 TapeStation Controller Software e execute as amostras (consulte o manual do utilizador do TapeStation para obter mais informações).
11. Quando a execução estiver concluída, inicie o TapeStation Analysis Software para ver os resultados (consulte o manual do utilizador do TapeStation para obter mais informações).
12. Registe os resultados no livro de trabalho.

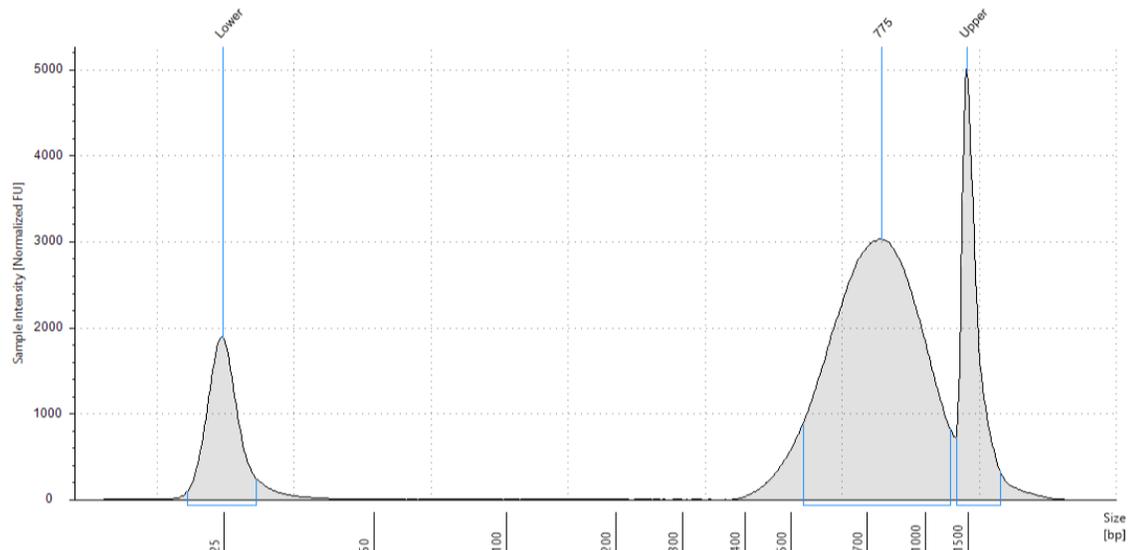


Figura 4.5.1: Imagem representativa do traço TapeStation para bibliotecas.

## 5. Captura híbrida (fluxo de trabalho Original)

### 5.0 Introdução ao protocolo

- Siga o protocolo AlloSeq Tx abaixo pela ordem indicada utilizando os parâmetros especificados.
- Antes de continuar, confirme os conteúdos do kit e certifique-se de que está presente o equipamento e os consumíveis necessários.
- Para maior facilidade de utilização, os passos do protocolo para a captura híbrida também são descritos detalhadamente no *Livro de trabalho de captura híbrida CE IVD IFU095-2\_AlloSeq Tx*. As referências ao livro de trabalho constantes no Capítulo 5 dizem respeito a este livro de trabalho.

### 5.1 Pooling de amostras

1. Introduza um ID de experiência no campo amarelo apropriado do livro de trabalho.
2. Introduza o número de pools a serem processados no campo amarelo apropriado do livro de trabalho.
3. Copie a informação de amostra apropriada do separador 1.1 LinearView do *Livro de trabalho de preparação de biblioteca CE IVD IFU095-1\_AlloSeq Tx* e cole-a na Lista de pool de biblioteca no *Livro de trabalho de captura híbrida CE IVD IFU095-2\_AlloSeq Tx* utilizando a opção de colar especial “Formatação de valores e números”.
4. Se realizar um pooling de  $\leq 12$  amostras, adicione 2,5  $\mu\text{L}$  de cada biblioteca a ser enriquecida a um tubo/faixa de PCR e adicione o volume apropriado de Resuspension Buffer a um total de 30  $\mu\text{L}$ , de acordo com a tabela abaixo.
5. Se realizar um pooling de  $> 12$  amostras, adicione 2,5  $\mu\text{L}$  de cada biblioteca a ser enriquecida a um tubo de microcentrifugação de 1,5 ml e avance para o passo de concentração (1.1 do livro de trabalho *Livro de trabalho de captura híbrida CE IVD IFU095-2\_AlloSeq Tx*).
6. Se processar múltiplos pools, duplique este separador e siga os passos 1-5 acima, identificando de forma única cada pool.

**NOTA:** as bibliotecas de baixo rendimento, incluindo as de preparações de ADN de célula bucal, podem beneficiar da utilização de um volume maior de introdução de biblioteca (que não exceda 30 µL de volume de introdução de biblioteca total combinado). Quando possível, é recomendado o processamento de bibliotecas de baixo rendimento (buciais) num pool de enriquecimento separado de bibliotecas de rendimento mais elevado (genómicas). Para um aconselhamento específico, contacte o seu representante técnico local.

## 5.2 Concentração de pool de biblioteca (opcional)

1. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por pool (µL)	Preparação necessária
Purification Beads (Purification Beads-1 para kits de 96 testes)	2 °C a 8 °C CAIXA 5	58,5 - 108	Coloque à temperatura ambiente durante, pelo menos, 30 minutos. <b>Armazene novamente após a utilização para os passos subsequentes.</b>
Água esterilizada	15°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	480	Nenhuma preparação necessária.
Etanol 100%	15°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	1.920	Prepare etanol 80%, conforme descrito abaixo.
Resuspension Buffer	2°C a 8°C CAIXA 5	32	Coloque à temperatura ambiente. <b>Armazene novamente após a utilização para os passos subsequentes.</b>

2. Prepare 80% de etanol fresco (2 lavagens por amostra) utilizando 1920 µL de etanol 100% e 480 µL de água esterilizada (inclui um volume em excesso).
3. Homogeneíze por vórtice e centrifugue todos os reagentes antes de utilizar.
4. Reúna os tubos de microcentrifugação de 1,5 ml necessários.

**NOTA:** o processo demora aproximadamente 30 minutos.

5. Faça o pool de bibliotecas de amostra num tubo de 1,5 ml, de acordo com as instruções do livro de trabalho 1.0 Pooling de amostras.
6. Adicione o volume apropriado (1,8x o volume de amostra de pooling ou veja os cálculos no livro de trabalho) de Purification Beads bem homogeneizadas por vórtice ao tubo de 1,5 ml que contém bibliotecas de pooling.
7. Homogeneíze por vórtice cada tubo a alta velocidade durante 10 segundos, 3 vezes.
8. Centrifugue rapidamente o tubo.
9. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.
10. Coloque o tubo num suporte magnético durante 1 minuto (até 2,5 minutos para bibliotecas de 96 amostras), deixando as esferas agruparem-se junto ao íman. Se o sobrenadante permanecer turvo, mantenha-o no íman até ficar transparente.
11. Utilizando uma pipeta, aspire e elimine o sobrenadante, deixando as esferas no tubo junto ao íman.
12. Mantendo o tubo no íman, lave duas vezes com etanol 80%:
  - a) Adicione 800 µL de etanol 80% a cada tubo,
  - b) Incube à temperatura ambiente durante 30 segundos,
  - c) Utilizando uma pipeta, aspire e elimine todo o sobrenadante,
  - d) Repita os passos a) a c) num total de 2 lavagens.
13. Remova todo o sobrenadante restante com uma pipeta P20.
14. Seque o tubo ao ar durante 5 minutos à temperatura ambiente para permitir que os restos de etanol se evaporem.
15. Adicione 32 µL de Resuspension Buffer a um tubo para eluir as bibliotecas.

16. Homogeneíze por vórtice cada tubo a alta velocidade durante 10 segundos, 3 vezes.
17. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.
18. Centrifugue rapidamente o tubo.
19. Coloque os tubos num suporte magnético durante 1 minuto, deixando as esferas agruparem-se nos tubos junto ao íman.
20. **Transfira** 30 µL de sobrenadante para um novo tubo/faixa de PCR para hibridação.

**NOTA:** Ponto de paragem segura. As bibliotecas podem ser armazenadas a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 1 semana, no máximo.

### 5.3 Hibridação de sonda

1. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por pool (µL)	Preparação necessária
AlloSeq Tx Probe Panel	-15 °C a -25 °C CAIXA 4	10	Coloque à temperatura ambiente.
Hybridisation Buffer 1	-15 °C a -25 °C CAIXA 4	50	Coloque em Hybex a 50 °C durante 15 minutos. Homogeneíze por vórtice e inspecione visualmente. Se restar precipitado, incube a 50 °C durante 15 minutos adicionais.
Hybridisation Buffer 2	2°C a 8°C CAIXA 5	10	Coloque à temperatura ambiente.

2. Homogeneíze por vórtice e centrifugue todos os reagentes antes de utilizar.
3. Reúna os tubos/faixas de PCR e tampas necessários.

**NOTA:** não existe um ponto de paragem segura antes do protocolo de captura. Os pools de amostra têm de avançar imediatamente após o passo de fixação de 62 °C da reação de termociclagem de hibridação para os passos de captura de esfera e lavagem aquecida.

**NOTA:** a configuração deste processo demora aproximadamente 20 minutos e, no mínimo, 2 horas e, no máximo, 18 horas no termociclador (reações deixadas de um dia para o outro ou até 18 horas têm de ser mantidas a uma temperatura de 62 °C no passo de fixação final de reação).

4. Para cada reação de hibridação, combine os seguintes reagentes pela ordem indicada abaixo num tubo/faixa de PCR:

Reagente	Volume por pool (µL)
Pool de bibliotecas de amostra	30
AlloSeq Tx Probe Panel	10
Hybridisation Buffer 1	50
Hybridisation Buffer 2	10
Total	100

5. Com uma pipeta configurada para 70 µL, efetue a pipetagem da mistura de cada poço de reação de hibridação 10 vezes, sele e, em seguida, centrifugue.
6. Se a solução continuar turva, efetue a pipetagem da mistura mais 6-8 vezes.

7. Coloque o tubo/faixa no termociclador e execute o programa de hibridação utilizando a tampa aquecida a 100 °C e um volume de reação de 100 µL:

#	Passo	Temperatura	Tempo	N.º de ciclos
1	Desnaturação	98°C	5 minutos	1
2	Redução gradual	98 °C - 62 °C, reduzindo 2 °C/ciclo	1 minuto	1
3	Avance para o passo 2 durante 18 ciclos adicionais (total de 19 ciclos) reduzindo 2 °C/ciclo.			
4	Hibridação	62°C	90 minutos	1
5	Fixação final	62°C	Fixação (não ultrapassar 18 horas a 62 °C, incluindo no passo n.º 4)	1

8. Deixe o tubo/faixa no termociclador até estar pronto para avançar para a captura. Assegure-se de que as esferas de captura atingiram a temperatura ambiente e que o Capture Wash Buffer e o Hybex são aquecidos a 58 °C.

## 5.4 Captura

9. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por pool (µL)	Preparação necessária
Capture Beads	2°C a 8°C CAIXA 5	250	<b>Coloque à temperatura ambiente durante, pelo menos, 30 minutos.</b>
Capture Wash Buffer	-15 °C a -25 °C CAIXA 4	800	<b>Pré-aqueça a 58 °C antes de utilizar.</b>
Capture Elution Buffer 1	-15 °C a -25 °C CAIXA 4	28.5	Coloque à temperatura ambiente.
2N NaOH	-15 °C a -25 °C CAIXA 4	1.5	Coloque à temperatura ambiente. <b>Armazene novamente após a utilização para os passos subsequentes.</b>
Capture Elution Buffer 2	2°C a 8°C CAIXA 5	4	Coloque à temperatura ambiente.

1. Prepare uma mistura de eluição master dos seguintes reagentes por pool a ser capturado:

Reagente	Volume por pool (µL)
Capture Elution Buffer 1	28.5
2N NaOH (fresco)	1,5

**NOTA:** a solução de NaOH absorve rapidamente o CO<sub>2</sub> da atmosfera, alterando o pH e o desempenho do reagente. Assegure-se de que o tubo de 2N NaOH está fechado quando não está a ser utilizado.

- Homogeneíze por vórtice e centrifugue todos os reagentes antes de utilizar.
- Reúna os tubos de microcentrifugação de 1,5 ml, tubos/faixas de PCR e tampas necessários.

**NOTA:** este processo demora aproximadamente 1 hora.

- Para cada reação de hibridação, adicione 250 µL de Capture Beads a um tubo novo de 1,5 mL.
- Transfira** 100 µL de cada reação de hibridação para o tubo respetivo com Capture Beads.
- Homogeneíze por vórtice o tubo a alta velocidade durante 10 segundos, 3 vezes. Não centrifugue.
- Incube o tubo no Hybex a 58 °C durante 15 minutos.
- Centrifugue rapidamente o tubo.
- Coloque imediatamente o tubo num suporte magnético durante 1 minuto, deixando as esferas agruparem-se junto ao íman.
- Utilizando uma pipeta, aspire e elimine o sobrenadante, deixando as esferas no tubo junto ao íman.

11. Lave três vezes com Capture Wash Buffer aquecido, conforme descrito abaixo:

**NOTA:** quando não estiver a ser utilizado, mantenha o Capture Wash Buffer no Hybex para manter uma temperatura de 58 °C. Retire-o apenas imediatamente antes de adicionar à reação no passo 12b e 14. Trabalhe com rapidez quando realizar os passos de lavagem aquecida, para minimizar o tempo durante o qual o pool/tampão da amostra permanece à temperatura ambiente.

- a) Retire o tubo do íman,
- b) Adicione 200 µL de Capture Wash Buffer (58 °C),
- c) Homogeneíze por vórtice o tubo a alta velocidade durante 10 segundos, 3 vezes. Não centrifugue.
- d) Incube o tubo no Hybex a 58 °C durante 5 minutos.
- e) Centrifugue e coloque imediatamente o tubo num suporte magnético de 1,5 ml durante 1 minuto, deixando as esferas agruparem-se junto ao íman.
- f) Utilizando uma pipeta, aspire e elimine o sobrenadante, deixando as esferas no tubo junto ao íman.
- g) Repita os passos a) a f) mais duas vezes, num total de 3 lavagens.

12. Retire o tubo do íman.

13. Adicione 200 µL de Capture Wash Buffer aquecido (58 °C).

14. Homogeneíze por vórtice o tubo a alta velocidade durante 10 segundos, 3 vezes. Não centrifugue.

15. **Transfira** todos os conteúdos (solução e esferas de lavagem) para um novo tubo de 1,5 mL.

**NOTA:** este passo de transferência é essencial para remover os inibidores de PCR que podem afetar o desempenho a jusante.

16. Incube o tubo no Hybex a 58 °C durante 5 minutos.

17. Centrifugue imediatamente e coloque o tubo num suporte magnético durante 1 minuto, deixando as esferas agruparem-se junto ao íman.

18. Utilizando uma pipeta, aspire e elimine o sobrenadante, deixando as esferas no tubo junto ao íman.

19. Centrifugue de forma rápida e coloque imediatamente o tubo num suporte magnético durante 1 minuto, deixando as esferas agruparem-se junto ao íman.

20. Utilizando uma pipeta P20, aspire e elimine o sobrenadante restante, deixando as esferas no tubo junto ao íman.

21. Homogeneíze por vórtice a mistura de eluição master preparada anteriormente e, em seguida, retire o tubo de reação do íman e adicione 23 µL de mistura de eluição master a cada tubo.

22. Homogeneíze por vórtice o tubo a alta velocidade durante 10 segundos, 3 vezes.

23. Incube à temperatura ambiente durante 2 minutos.

24. Centrifugue rapidamente o tubo.

25. Coloque o tubo num suporte magnético durante 1 minuto, deixando as esferas agruparem-se junto ao íman.

26. **Transfira** 21 µL de sobrenadante para um novo tubo/faixa de PCR.

27. Adicione 4 µL de Capture Elution Buffer 2.

28. Efetue a pipetagem da mistura 6-8 vezes. O volume final é de 25 µL.

**NOTA:** Ponto de paragem segura. As bibliotecas podem ser armazenadas a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 24 horas, no máximo.

## 5.5 PCR de pós-enriquecimento

1. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por pool (µL)	Preparação necessária
PCR Primers	-15 °C a -25 °C CAIXA 4	5	Descongele em gelo. Inverta para misturar e, em seguida, centrifugue durante breves instantes.
PCR Mix (ou PCR Mix-2 para kits de 96)	-15 °C a -25 °C CAIXA 4	20	Descongele à temperatura ambiente e, em seguida, coloque em gelo.

2. Homogeneíze por vórtice e centrifugue todos os reagentes antes de utilizar.
3. Reúna os tubos de PCR necessários com bibliotecas de captura do passo 5.4 Captura.

**NOTA:** este processo demora aproximadamente 5 minutos a configurar, **1:40** horas no termociclador.

4. Adicione 5 µL de PCR Primers às bibliotecas capturadas no tubo de PCR.
5. Adicione 20 µL de PCR Mix ao tubo.
6. Efetue a pipetagem da mistura 10 vezes.
7. Centrifugue rapidamente o tubo.
8. Coloque o tubo/faixa no termociclador e execute o programa de PCR de pós-enriquecimento utilizando a tampa aquecida a 105 °C e um volume de reação de 50 µL:

#	Passo	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
1	Desnaturação	98°C	30 segundos	1
2	Desnaturação	98°C	1 minuto	17
3	Hibridação	60°C	30 segundos	
4	Extensão	72°C	3 minutos	
5	Extensão final	72°C	5 minutos	1
6	Fixação final	10°C	Fixação	1

**NOTA:** Ponto de paragem segura. As bibliotecas podem ser armazenadas a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 1 semana, no máximo.

**NOTA:** se avançar imediatamente para a purificação, assegure-se de que as Purification Beads são colocadas à temperatura ambiente antes da utilização.

## 5.6 Purificação do PCR de pós-enriquecimento

1. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por pool (µL)	Preparação necessária
Purification Beads (Purification Beads-2 para kit de 96)	2 °C a 8 °C CAIXA 5	27	Coloque à temperatura ambiente durante, pelo menos, 30 minutos.
Água esterilizada	15°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	80	Nenhuma preparação necessária.
Etanol 100%	15°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	320	Prepare etanol 80%, conforme descrito abaixo.
Resuspension Buffer	2°C a 8°C CAIXA 5	32	Coloque à temperatura ambiente. <b>Armazene novamente após a utilização para os passos subsequentes.</b>

2. Prepare 80% de etanol fresco (2 lavagens por amostra) utilizando 480 µL de etanol 100% e 120 µL de água esterilizada (inclui um volume em excesso).
3. Homogeneíze por vórtice e centrifugue todos os reagentes antes de utilizar.
4. Reúna os tubos de microcentrifugação de 1,5 ml necessários.

**NOTA:** o processo demora aproximadamente **30** minutos.

5. Para cada reação de purificação, adicione 27 µL de Purification Beads bem homogeneizadas por vórtice a um tubo novo de 1,5 ml.
6. **Transfira** 45 µL de cada reação de PCR de pós-enriquecimento para o tubo respetivo com Purification Beads.
7. Homogeneíze por vórtice cada tubo a alta velocidade durante 10 segundos, 3 vezes.
8. Centrifugue rapidamente o tubo.

9. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.
10. Coloque o tubo num suporte magnético durante 1 minuto ou até que as esferas se agrupem junto ao íman.
11. Utilizando uma pipeta, aspire e elimine o sobrenadante, deixando as esferas no tubo junto ao íman.
12. Mantendo o tubo no íman, lave duas vezes com etanol 80%:
  - a) Adicione 200 µL de etanol 80% a cada tubo,
  - b) Incube à temperatura ambiente durante 30 segundos,
  - c) Utilizando uma pipeta, aspire e elimine todo o sobrenadante,
  - d) Repita os passos a) a c) num total de 2 lavagens.
13. Remova todo o sobrenadante restante com uma pipeta P20.
14. Seque o tubo ao ar durante 5 minutos à temperatura ambiente para permitir que os restos de etanol se evaporem.
15. Retire o tubo do íman e adicione 32 µL de Resuspension Buffer a cada tubo para eluir os fragmentos-alvo.
16. Homogeneíze por vórtice cada tubo a alta velocidade durante 10 segundos, 3 vezes.
17. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.
18. Centrifugue rapidamente o tubo.
19. Coloque os tubos num suporte magnético durante 1 minuto, deixando as esferas agruparem-se nos tubos junto ao íman.
20. **Transfira** 30 µL de sobrenadante para um novo tubo de 1,5 ml, para armazenamento.

**NOTA:** Ponto de paragem segura. As bibliotecas podem ser armazenadas a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 1 mês, no máximo.

## 5.7 Quantificação Qubit

1. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por pool (µL)	Preparação necessária
Tampão Qubit BR	-25°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	199	Nenhuma preparação necessária.
Corante Qubit BR	-25°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	1	Nenhuma preparação necessária.
Padrão BR #1	2°C a 8°C Fornecido pelo utilizador	10	Coloque à temperatura ambiente.
Padrão BR #2	2°C a 8°C Fornecido pelo utilizador	10	Coloque à temperatura ambiente.

2. Reúna os tubos Qubit e o tubo de 1,5 ml ou 5 ml necessários para a preparação da solução de trabalho, dependendo do volume necessário.
3. Prepare dois tubos de ensaio para os padrões e um para cada pool.
4. Prepare a solução de trabalho Qubit de 200 µL utilizando 199 µL de tampão Qubit e 1 µL de corante Qubit por amostra/padrão a ser quantificado.
5. Homogeneíze por vórtice a solução de trabalho durante 2-3 segundos e, em seguida, centrifugue.
6. Alíquota **190 µL** de solução de trabalho por cada tubo padrão.
7. Alíquota **198 µL** de solução de trabalho por cada tubo de pool.
8. Alíquota **10 µL** de solução padrão por cada tubo padrão respetivo.
9. Alíquota **2 µL** de cada pool pelo respetivo tubo.
10. Homogeneíze por vórtice todos os tubos durante 2-3 segundos e, em seguida, centrifugue.
11. Incube os tubos durante 2 minutos à temperatura ambiente.

12. Insira os tubos no Fluorómetro Qubit e efetue as leituras (consulte o protocolo do fabricante Qubit para obter mais informações).
13. Registe as leituras Qubit na tabela do livro de trabalho para calcular a concentração média.

## 5.8 Visualização TapeStation (opcional)

**NOTA:** mediante uma validação do utilizador, podem ser utilizados sistemas alternativos para visualização de fragmento, tais como o Fragment Analyzer, o Bioanalyzer ou semelhantes.

1. Reúna os reagentes necessários (volume especificado na tabela abaixo) e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Volume por pool (µL)	Preparação necessária
D1000 Ladder	2°C a 8°C Fornecido pelo utilizador	1	Coloque à temperatura ambiente.
D1000 Sample Buffer	2°C a 8°C Fornecido pelo utilizador	3	Coloque à temperatura ambiente.

2. Reúna o ScreenTape D1000 necessário, as tampas e as faixas óticas de tubo TapeStation.
3. Transfira 1 µL de cada pool para um novo tubo.
4. Adicione 1 µL de D1000 Ladder a um tubo de referência.
5. Adicione 3 µL de tampão de amostra D1000 a cada tubo de pool e tubo de referência.
6. Sele todos os tubos com tampas.
7. Homogeneíze por vórtice com uma placa IKA a 2000 rpm durante 1 minuto.
8. Centrifugue durante breves instantes para garantir que todas as amostras se encontram no fundo dos tubos.
9. Destape e carregue os tubos de amostra no instrumento 2200 TapeStation.
10. Selecione os tubos necessários no 2200 TapeStation Controller Software e execute as amostras (consulte o manual do utilizador do TapeStation para obter mais informações).
11. Quando a execução estiver concluída, inicie o TapeStation Analysis Software para ver os resultados (consulte o manual do utilizador do TapeStation para obter mais informações).
12. Registe as leituras na tabela do livro de trabalho.

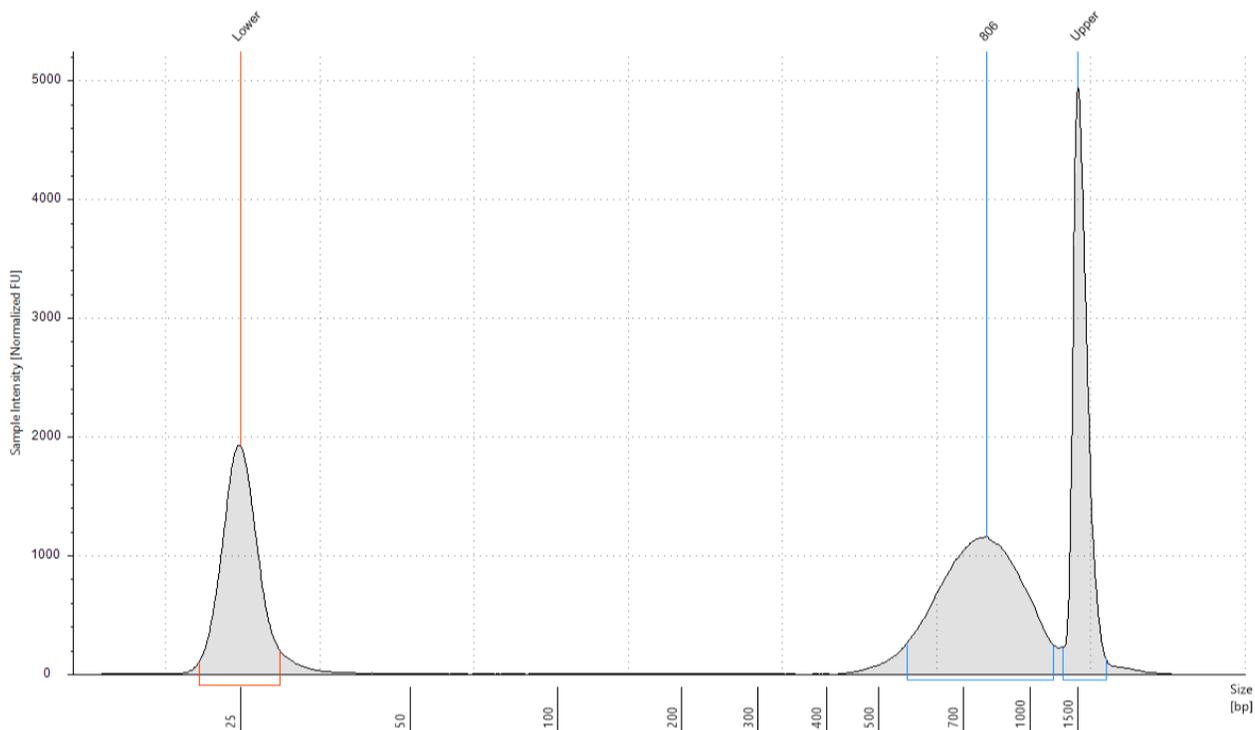


Figura 5.8.1: Imagem representativa do traço TapeStation para pool de biblioteca enriquecida final.

## 6. Sequenciação

### 6.0 Introdução ao protocolo

As bibliotecas AlloSeq Tx são validadas para uma sequenciação realizada em sequenciadores Illumina, incluindo MiSeq, MiniSeq ou iSeq, em que os dados de sequência resultantes são produzidos em formato de ficheiro fastq. O número de amostras adicionadas a cada pool enriquecido determinarão a célula de fluxo do sequenciador necessária, conforme apresentado na secção 1.3 *Conteúdo de gene-alvo do AlloSeq Tx* das presentes instruções de utilização.

- Siga o protocolo AlloSeq Tx abaixo pela ordem indicada utilizando os parâmetros especificados.
- Antes de continuar, confirme os conteúdos do kit e certifique-se de que está presente o equipamento e os consumíveis necessários.
- Para maior facilidade de utilização, os passos da Sequenciação também são descritos no *Livro de trabalho de pooling precoce CE IVD IFU095-5\_AlloSeq Tx* (Fluxo de trabalho Pooling precoce) e *Livro de trabalho de sequenciação CE IVD IFU095-3\_AlloSeq Tx* (Fluxo de trabalho Original). As referências ao livro de trabalho constantes no Capítulo 6 dizem respeito a estes livros de trabalho.
- Os sequenciadores devem ser carregados de acordo com o protocolo do instrumento, conforme indicado nas instruções abaixo.
- Se utilizar um instrumento MiSeq, recomenda-se realizar a lavagem de branqueamento da linha do modelo (hipoclorito de sódio) de acordo com as instruções do manual do utilizador do MiSeq para obter o desempenho ideal.

**NOTA:** o ficheiro .csv formatado de importação de amostra de sequenciação Illumina pode ser gerado e guardado conforme descrito no *Livro de trabalho de pooling precoce CE IVD IFU095-5\_AlloSeq Tx* (Folha de cálculo “1.0 Sample\_Prep”), do “1.2 SampleSheet” (Fluxo de trabalho Pooling precoce) ou *Livro de trabalho de preparação de*

biblioteca CE IVD IFU095-1\_AlloSeq Tx (Folha de cálculo “1.0 Sample\_Prep”), do “1.2 SampleSheet” (Fluxo de trabalho Original).

## 6.1 Preparação de PhiX

1. Reúna os reagentes necessários e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Preparação necessária
PhiX a 10 nM	-15 °C a -25 °C Fornecido pelo utilizador	Descongele e mantenha em gelo.
2N NaOH	-15 °C a -25 °C CAIXA 4	Coloque à temperatura ambiente.
Água esterilizada	15°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	Nenhuma preparação necessária.
Resuspension Buffer	2°C a 8°C CAIXA 5	Coloque à temperatura ambiente.
HT1 (com cartucho de sequenciação)	-15 °C a -25 °C Fornecido pelo utilizador	Descongele e mantenha em gelo.

2. Prepare uma solução de trabalho 0.2 NaOH utilizando 45 µL de água esterilizada e 5 µL de 2N NaOH.

**NOTA:** a solução de NaOH absorve rapidamente o CO<sub>2</sub> da atmosfera, alterando o pH e o desempenho do reagente. Assegure-se de que o tubo de 2N NaOH está fechado quando não está a ser utilizado.

3. Homogeneíze por vórtice e centrifugue todos os reagentes antes de utilizar.
4. Reúna os tubos de microcentrifugação de 1,5 ml necessários.

### 6.1.1 Diluir e desnaturar PhiX para execuções MiSeq e MiniSeq

1. Adicione 3 µL de Resuspension Buffer a um tubo novo.
2. Adicione 2 µL de PhiX a 10 nM ao tubo.
3. Adicione 5 µL de solução de trabalho 0.2N NaOH (conforme diluído acima) ao tubo.
4. Homogeneíze por vórtice e centrifugue o tubo.
5. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.
6. Adicione 990 µL de HT1 pré-refrescado ao tubo com PhiX desnaturado.
7. **Inverta para misturar** (NÃO homogeneíze por vórtice) e, em seguida, centrifugue o tubo.

**NOTA:** isto resulta em 1 ml de PhiX a 20 pM pronto para utilização em execuções MiSeq. Para execuções MiniSeq, realize a diluição adicional configurada para 5 pM, descrito abaixo. O PhiX desnaturado pode ser armazenado a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 1 mês, no máximo.

### 6.1.2 Para execuções MiniSeq, diluir adicionalmente o PhiX a 5 pM

1. Introduza o volume de diluição pretendido no livro de trabalho para calcular a diluição apropriada para o PhiX.
2. Dilua o PhiX a 5 pM combinando o volume de reagente (consulte o livro de trabalho) num tubo de microcentrifugação.
3. **Inverta para misturar** (NÃO homogeneíze por vórtice) e, em seguida, centrifugue o tubo.

**NOTA:** o PhiX desnaturado pode ser armazenado a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 1 mês, no máximo.

### 6.1.3 Para execuções iSeq, diluir o PhiX a 20 pM (sem desnaturação)

1. Introduza o volume de diluição pretendido no livro de trabalho para calcular a diluição apropriada para o PhiX.
2. Dilua o PhiX a 20 pM combinando o volume de reagente (consulte o livro de trabalho) num tubo de microcentrifugação.
3. **Inverta para misturar** (NÃO homogeneíze por vórtice) e, em seguida, centrifugue o tubo.

**NOTA:** o PhiX desnaturado pode ser armazenado a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 1 mês, no máximo.

### 6.2 Diluir e desnaturar para MiSeq

1. Reúna os reagentes necessários e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Preparação necessária
Pool de amostra enriquecida AlloSeq Tx	-15 °C a -25 °C Preparado pelo utilizador	Descongele e mantenha em gelo.
2N NaOH	-15 °C a -25 °C CAIXA 4	Coloque à temperatura ambiente.
Água esterilizada	15°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	Nenhuma preparação necessária.
HT1 (com cartucho MiSeq)	-15 °C a -25 °C Fornecido pelo utilizador	Descongele e mantenha em gelo.
Resuspension Buffer	2°C a 8°C CAIXA 5	Coloque à temperatura ambiente.
PhiX a 20 pM (previamente diluído)	-15 °C a -25 °C Fornecido pelo utilizador	Descongele e mantenha em gelo.

2. Prepare uma solução de trabalho 0.2N NaOH utilizando 45 µL de água esterilizada e 5 µL de 2N NaOH.

**NOTA:** a solução de NaOH absorve rapidamente o CO<sub>2</sub> da atmosfera, alterando o pH e o desempenho do reagente. Assegure-se de que o tubo de 2N NaOH está fechado quando não está a ser utilizado.

3. Homogeneíze por vórtice e centrifugue todos os reagentes antes de utilizar.
4. Reúna os tubos de microcentrifugação de 1,5 ml necessários.
5. Introduza a concentração de pool de amostra enriquecida, o tamanho do fragmento (espera-se aproximadamente 800 bp) e o volume total pretendido (recomenda-se 30 µL) a 4 nM no livro de trabalho, para calcular a diluição apropriada para a biblioteca.
6. Dilua o pool de amostra a 4 nM combinando os reagentes (consulte o livro de trabalho) num tubo de microcentrifugação.
7. Homogeneíze por vórtice e centrifugue o pool de amostra diluída antes de continuar a utilizar.
8. Adicione 5 µL de pool de amostra enriquecida a 4 nM a um tubo novo.
9. Adicione 5 µL de solução de trabalho 0.2N NaOH (conforme diluído acima) ao tubo.
10. Homogeneíze por vórtice e centrifugue o tubo.
11. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.
12. Adicione 990 µL de HT1 pré-refrescado ao tubo com o pool de amostra enriquecida desnaturada.
13. **Inverta para misturar** (NÃO homogeneíze por vórtice) e, em seguida, centrifugue o tubo.

**NOTA:** isto resulta em 1 ml de pool de amostra a 20 pM. Os pools podem ser armazenados a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 1 mês, no máximo.

14. Introduza o número de pools a serem combinados para sequenciação, a concentração de carregamento (recomendados 12 pM), a percentagem pretendida de pico de PhiX (recomendado, no mínimo, 1%) e o volume de carregamento (no mínimo, 600 µL) no livro de trabalho, para calcular a diluição apropriada para a biblioteca.
15. Dilua o pool de amostra para a concentração de carregamento combinando os reagentes (consulte o manual de instruções) num tubo de microcentrifugação.
16. **Inverta para misturar** (NÃO homogeneíze por vórtice) e, em seguida, centrifugue o tubo.
17. Coloque à parte em gelo até estar pronto para carregar no cartucho de reagente MiSeq para sequenciação.

**NOTA:** os pools podem ser armazenados a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 48 horas, no máximo, antes da sequenciação.

18. Avance para o carregamento de MiSeq de acordo com o protocolo do instrumento.

### 6.3 Diluir e desnaturar para MiniSeq

1. Reúna os reagentes necessários e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Preparação necessária
Pool de amostra enriquecida AlloSeq Tx	-15 °C a -25 °C Preparado pelo utilizador	Descongele e mantenha em gelo.
2N NaOH	-15 °C a -25 °C CAIXA 4	Coloque à temperatura ambiente.
Água esterilizada	15°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	Nenhuma preparação necessária.
HT1 (com cartucho de sequenciação)	-15 °C a -25 °C Fornecido pelo utilizador	Descongele e mantenha em gelo.
Resuspension Buffer	2°C a 8°C CAIXA 5	Coloque à temperatura ambiente.
200 mM Tris-HCl, pH 7,0	15°C a 30°C Fornecido pelo utilizador	Nenhuma preparação necessária.
PhiX a 5 pM (previamente diluído)	-15 °C a -25 °C Fornecido pelo utilizador	Descongele e mantenha em gelo.

2. Prepare uma solução de trabalho 0.1N NaOH utilizando 95 µL de água esterilizada e 5 µL de 2N NaOH.

**NOTA:** a solução de NaOH absorve rapidamente o CO<sub>2</sub> da atmosfera, alterando o pH e o desempenho do reagente. Assegure-se de que o tubo de 2N NaOH está fechado quando não está a ser utilizado.

3. Homogeneíze por vórtice e centrifugue todos os reagentes antes de utilizar.
4. Reúna os tubos de microcentrifugação de 1,5 ml necessários.
5. Introduza a concentração de pool de amostra enriquecida, o tamanho do fragmento (espera-se aproximadamente 800 bp) e o volume total pretendido (recomenda-se 100 µL) a 1 nM no livro de trabalho, para calcular a diluição apropriada para a biblioteca.
6. Dilua o pool de amostra a 1 M combinando os reagentes (consulte o manual de instruções) num tubo de microcentrifugação.
7. Homogeneíze por vórtice e centrifugue o pool de amostra diluída antes de continuar a utilizar.
8. Adicione 5 µL de pool de amostra enriquecida a 1 nM a um tubo novo.
9. Adicione 5 µL de solução de trabalho 0.1N NaOH (conforme diluído acima) ao tubo.

10. Homogeneíze por vórtice e centrifugue o tubo.
11. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.
12. Adicione 5 µL de 200 mM Tris-HCl, a pH 7,0.
13. Homogeneíze por vórtice e centrifugue o tubo.
14. Adicione 985 µL de HT1 pré-refrescado ao tubo com o pool de amostra enriquecida desnaturada.
15. **Inverta para misturar** (NÃO homogeneíze por vórtice) e, em seguida, centrifugue o tubo.

**NOTA:** isto resulta em 1 ml de pool de amostra a 5 pM. Os pools podem ser armazenados a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 1 mês, no máximo.

16. Introduza o número de pools a serem combinados para sequenciação, a concentração de carregamento (recomendado 1,6 pM), a percentagem pretendida de pico de PhiX (recomendado, no mínimo, 1%) e o volume de carregamento (no mínimo, 500 µL) no livro de trabalho, para calcular a diluição apropriada para a biblioteca.
17. Dilua o pool de amostra para a concentração de carregamento combinando os reagentes (consulte o manual de instruções) num tubo de microcentrifugação.
18. **Inverta para misturar** (NÃO homogeneíze por vórtice) e, em seguida, centrifugue o tubo.
19. Coloque à parte em gelo até estar pronto para carregar no cartucho de reagente MiniSeq para sequenciação.

**NOTA:** os pools podem ser armazenados a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 48 horas, no máximo, antes da sequenciação.

20. Avance para o carregamento de MiniSeq de acordo com o protocolo do instrumento.

## 6.4 Diluir para iSeq

1. Reúna os reagentes necessários e prepare de acordo com a tabela:

Reagente	Condições de armazenamento	Preparação necessária
Pool de amostra enriquecida AlloSeq Tx	-15 °C a -25 °C Preparado pelo utilizador	Descongele e mantenha em gelo.
Resuspension Buffer	2°C a 8°C CAIXA 5	Coloque à temperatura ambiente.
PhiX a 20 pM (previamente diluído)	-15 °C a -25 °C Fornecido pelo utilizador	Descongele e mantenha em gelo.

2. Homogeneíze por vórtice e centrifugue todos os reagentes antes de utilizar.
3. Reúna os tubos de microcentrifugação de 1,5 ml necessários.
4. Introduza a concentração de pool de amostra enriquecida, o tamanho do fragmento (espera-se aproximadamente 800 bp) e o volume total pretendido (recomenda-se 100 µL) a 1 nM no livro de trabalho, para calcular a diluição apropriada para a biblioteca.
5. Dilua o pool de amostra a 1 nM combinando os reagentes (consulte o manual de instruções) num tubo de microcentrifugação.
6. Homogeneíze por vórtice e centrifugue o pool de amostra diluída antes de continuar a utilizar.
7. Introduza o número de pools a combinar para sequenciação, a concentração de carregamento (recomenda-se 200 pM), a percentagem pretendida de pico de PhiX (recomenda-se, no mínimo, 1%) e o volume de carregamento (no mínimo, 100 µL) no livro de trabalho, para calcular a diluição apropriada para a biblioteca.
8. Dilua o pool de amostra para a concentração de carregamento combinando os reagentes (consulte o manual de instruções) num tubo de microcentrifugação.
9. **Inverta para misturar** (NÃO homogeneíze por vórtice) e, em seguida, centrifugue o tubo.
10. Coloque à parte em gelo até estar pronto para carregar no cartucho de reagente iSeq para sequenciação.

**NOTA:** os pools podem ser armazenados a uma temperatura entre -15 °C e -25 °C durante 48 horas, no máximo, antes da sequenciação.

- Avance para o carregamento de 20 µL de pool de amostra diluída no cartucho iSeq de acordo com o protocolo do instrumento.

## 7. Análise de sequência

Os ficheiros Fastq resultantes devem ser analisados utilizando o software AlloSeq Assign. Os procedimentos para utilização do software AlloSeq Assign podem ser consultados nas *Instruções de utilização do Assign CE IVD IFU094\_AlloSeq*.

## 8. Guia de resolução de problemas

PROBLEMA	CAUSA(S) POSSÍVEL(EIS)	Resolução
Baixo ou nenhum rendimento da preparação de biblioteca (detetado pela quantificação Qubit)	ADN introduzido de má qualidade ou baixa concentração	Avalie a qualidade do ADN através de eletroforese em gel. O ADN intacto deve ser de aprox. 3 kb com poucos ou nenhuns sinais de borrão no gel. Volte a extrair o ADN e repita o procedimento, se possível.
	Tipo incorreto de amostra primária utilizado.	Evite utilizar amostras de sangue total com heparina. Volte a extrair o ADN de sangue total preservado ACD ou EDTA e repita o procedimento, se possível.
	Bibliotecas perdidas durante a captura	Consulte o protocolo. Assegure que são realizados corretamente os passos de purificação que retêm o sobrenadante e que eliminam o sobrenadante. Assegure que a concentração de etanol é a correta. Utilizar apenas água ou conteúdo com água em excesso poderá eluir o ADN prematuramente.
	Bibliotecas não eluídas de esferas de captura	Consulte o protocolo. Assegure uma ordem correta dos tampões de eluição utilizados. Assegure uma remoção adequada dos reagentes/tampões antes da ressuspensão e da eluição. Evite uma secagem excessiva do ADN ou dos pellets de ADN ligados às esferas durante os passos de secagem. Uma secagem prolongada dos pellets de ADN pode impedir a ressuspensão e o rendimento subsequente.
	Falha da adição de reagentes essenciais (ou seja, esfera, primer de índice, mistura de PCR master, etc.) ou falha na utilização pela ordem correta.	Consulte o protocolo. Assegure que os reagentes foram adicionados pela ordem correta e no volume correto. Verifique se o volume de reagente residual é excessivo. Repita o procedimento, se indicado.
	Incubação incorreta ou condições ciclagem incorretas	Reveja as condições do termociclador: Programa de tagmentação Programa de PCR de indexação
Baixo ou nenhum rendimento de enriquecimento (detetado pela quantificação Qubit)	Bibliotecas perdidas durante a captura	Reveja o protocolo e assegure que são realizados corretamente os passos que requerem a retenção de sobrenadante e a eliminação de sobrenadante. Assegure que as Purification Beads diluídas têm a concentração correta e que são utilizadas as Purification Beads não diluídas (não resíduos de esferas diluídas) após a seleção do tamanho.

PROBLEMA	CAUSA(S) POSSÍVEL(EIS)	Resolução
	As bibliotecas não foram eluídas a partir das esferas de captura	Assegure uma ordem correta dos tampões de eluição utilizados. Assegure uma remoção adequada dos reagentes/tampões antes da ressuspensão e da eluição. Evite uma secagem excessiva do ADN ou dos pellets de ADN ligados às esferas durante os passos de secagem. Uma secagem prolongada dos pellets de ADN pode reduzir a capacidade de ressuspensão da solução e o rendimento subsequente.
	Incubação incorreta ou condições de ciclagem incorretas	Reveja as condições do termociclador: Programa de hibridação Programa de PCR de pós-enriquecimento
Fragmentos de tamanho incorreto após preparação ou enriquecimento da biblioteca (detetados através da análise de fragmento)	Razão incorreta de amostra em relação às Purification Beads.	Repita o protocolo. Assegure que é utilizada uma concentração de esferas correta durante a seleção do tamanho e os passos de purificação do protocolo.
A sequenciação falhou		Verifique se o protocolo foi seguido. Consulte o respetivo manual do utilizador do modelo de sequenciador utilizado.
Baixa cobertura para loci alvo no Assign, apesar do elevado rendimento de enriquecimento.	Fragmentos não específicos capturados devido a uma temperatura mais baixa durante os passos de captura e lavagem aquecida.	Assegure que o Hybex utilizado nos passos de lavagem aquecida é calibrado e conservado. Trabalhe com rapidez durante os passos de lavagem aquecida para garantir que a temperatura do pool não diminui substancialmente.

## 9. Informação de suporte

O protocolo descrito neste manual pressupõe que reviu os conteúdos desta secção e que confirmou e obteve todos os equipamentos e consumíveis necessários.

### Licença

Os kits AlloSeq Tx contêm reagentes Nextera Flex for Enrichment, que são fabricados pela Illumina Inc. para distribuição pela CareDx Pty Ltd.

### Consumíveis e equipamentos necessários, mas não fornecidos

Os consumíveis e equipamentos indicados abaixo são necessários para a realização do ensaio, mas não estão incluídos no kit AlloSeq Tx.

O protocolo foi otimizado e validado através dos itens apresentados. Um desempenho comparável não é garantido quando são utilizados consumíveis e equipamentos alternativos.

Consumível	Fornecedor/N.º de catálogo
Água de classe PCR	Sigma-Aldrich, W3500
Etanol absoluto para biologia molecular	Fornecedor geral de laboratório
Kit de ensaio Qubit™ dsDNA BR	Thermo Fisher Scientific, Q32850 ou Q32853
Tubos de ensaio Qubit™	Thermo Fisher Scientific, Q32856
D1000 ScreenTape (opcional)	Agilent Technologies, 5067-5584

<b>Consumível</b>	<b>Fornecedor/N.º de catálogo</b>
D1000 Reagents (opcional)	Agilent Technologies, 5067-5585
Placas de amostra de 96 poços (opcional)	Agilent Technologies, 5067-5150
Vedante de película para placas de 96 poços (opcional)	Agilent Technologies, 5067-5154
Faixas óticas para tubo (8 x faixas) (opcional)	Agilent Technologies, 401428
Tampas para faixas óticas para tubo (8 x faixas) (opcional)	Agilent Technologies, 401425
<b>Um dos seguintes kits de reagente de sequenciação:</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• MiSeq V2 Standard (300 ciclos)</li> <li>• MiSeq V2 Micro (300 ciclos)</li> <li>• MiSeq V2 Nano (300 ciclos)</li> <li>• MiniSeq Mid Output Kit (300 ciclos)</li> <li>• iSeq 100 i1 Reagent v2 (300 ciclos)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Illumina, MS-102-2002</li> <li>• Illumina, MS-103-1002</li> <li>• Illumina, MS-103-1001</li> <li>• Illumina, FC-420-1004</li> <li>• Illumina, 20031371</li> </ul>
PhiX Control v3	Illumina, FC-110-3001
Pontas de pipeta de barreira de 20 µl	Fornecedor geral de laboratório
Pontas de pipeta de barreira de 200 µl	Fornecedor geral de laboratório
Pontas de pipeta de barreira de 1000 µl	Fornecedor geral de laboratório
Tubos de microcentrifugação de 1,5 ml	Fornecedor geral de laboratório
Tubos de 5 ml	Fornecedor geral de laboratório
Tubos cónicos de centrifugação de 15 ml	Fornecedor geral de laboratório
Reservatórios de reagentes de 25 ml	Fornecedor geral de laboratório
Faixas de 8 tubos de PCR de 0,2 ml com tampas	Fornecedor geral de laboratório
Placas de PCR de 96 poços	Fornecedor geral de laboratório
Vedantes adesivos Microseal "B"	Bio-Rad, MSB1001
Placa de armazenamento (placa MIDI, só no fluxo de trabalho Original) de poço profundo em polipropileno de 0,8 ml de 96 poços Abgene™	Thermo Fisher, AB0859 ou AB0765
Hipoclorito de sódio (NaOCl) para lavagem após a execução da sequenciação (opcional)	Sigma, 239305

<b>Equipamento</b>	<b>Fornecedor/N.º de catálogo</b>
Pipeta de 20 µl	Fornecedor geral de laboratório
Pipeta de 200 µl	Fornecedor geral de laboratório
Pipeta de 1000 µl	Fornecedor geral de laboratório
Pipetas multicanal de 20 µl	Fornecedor geral de laboratório
Pipetas multicanal de 200 µl	Fornecedor geral de laboratório
Microcentrifugadora	Fornecedor geral de laboratório
Centrifugadora de microplaca	Fornecedor geral de laboratório
Sistema por vórtice	Fornecedor geral de laboratório
Rolo de película vedante	Fornecedor geral de laboratório
Index Fixture Plate	Illumina, FC-130-1005
Um dos seguintes suportes magnéticos:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Íman DynaMag™-2</li> <li>• Rack de separação MagJET, 2 tubos de 1,5 ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Thermo Fisher, 12321D</li> <li>Thermo Fisher, MR01</li> </ul>
Magnetic Stand-96	Thermo Fisher, AM10027
BioShake iQ ou	BioShake iQ, 1808-0506
BioShake XP	BioShake XP, 1808-0505
Agilent 2200 TapeStation System (opcional)	Agilent Technologies
Fluorómetro Qubit	Thermo Fisher
Um dos seguintes termocicladores de 96 poços:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Termociclador de 96 poços Veriti™</li> <li>• Termociclador Eppendorf</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Thermo Fisher, 4375786</li> <li>Eppendorf, 6325000560</li> </ul>
Sistema Hybex	SciGene, 1057-30-2
Bloco de tubos de 1,5 ml Hybex. (32 tubos de 1,5 ml).	SciGene, 1057-34-0
Um dos seguintes sequenciadores:	

**Consumível****Fornecedor/N.º de catálogo**

---

• Illumina MiSeq	Illumina, SY-410-1003
• Illumina MiniSeq	Illumina, SY-420-1001
• Illumina iSeq	Illumina, 20021532

---

# 10. Informações de contacto

## **Fabricante:**

CareDx Pty Ltd,  
20 Collie Street, Fremantle, WA, Austrália, 6160.  
Tel.: +61-8-9336-4212  
E-mail: [orders-aus@caredx.com](mailto:orders-aus@caredx.com)  
Website: <http://www.caredx.com>

## **Distribuído por:**

*Ásia-Pacífico (APAC)*  
CareDx Pty Ltd,  
20 Collie Street, Fremantle, WA, Austrália, 6160.  
Tel.: +61-8-9336-4212  
E-mail: [orders-aus@caredx.com](mailto:orders-aus@caredx.com)  
Website: <http://www.caredx.com>

*Europa, Médio Oriente e África (EMEA)*  
CareDx AB,  
Franzégatan 5, SE-112 51 Estocolmo, Suécia.  
Tel.: +46-8-508 939 00  
Fax: +46-8-717 88 18  
E-mail: [orders-se@caredx.com](mailto:orders-se@caredx.com)  
Website: <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  
Email: [orders-us@caredx.com](mailto:orders-us@caredx.com)  
Website: <http://www.caredx.com>

## **Assistência técnica e comunicação de incidentes graves:**

E-mail: [techsupport-global@caredx.com](mailto:techsupport-global@caredx.com)

Qualquer incidente grave que tenha ocorrido relacionado com o dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e à autoridade competente do Estado-Membro onde o utilizador e/ou o paciente está estabelecido

Para obter mais informações, visite o website da CareDx (<https://www.caredx.com/contact-us/>).

## **Produtos relacionados:**

IVD com marcação CE:  
AlloSeq Assign

# 11. Referências

1. Nota técnica Illumina. **Nextera XT library prep: tips and troubleshooting** (06/29/18)
2. Nota técnica 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 também as citações incluídas)
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 também as citações incluídas)
6. Al-Soud WA, Rådström P. **Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples.** Appl 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.** Transplantation. 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.** Transfusion. 1992 32:83-5.
11. Burgess LC, Hall JO. **UV Light Irradiation of Plastic Reaction Tubes Inhibits PCR.** Biotechniques. 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.** Genome Res. 2014 24:2033-44.
13. Steiniger M, Adams CD, Marko JF, Reznikoff WS. **Defining characteristics of Tn5 Transposase non-specific DNA binding.** Nucl Acid Res. 2006 34:2920-34.
14. **CareDx AlloSure Interfering Substances report** 2018.

## Histórico de método

Versão	Data	Modificação	Autorizado por
1.0	19Feb20	Primeira versão das Instruções de utilização do AlloSeq Tx com marcação CE. Editado por E. Naughton em 19fev20	L. Westwood
1.1	28Apr20	Adicionou à secção de limitações «O ensaio AlloSeq Tx sequencia fragmentos de ADN com um tamanho médio de 700 bp, o que significa que polimorfismos com um distanciamento superior a 700 bp não podem ser faseados, o que pode resultar em ambiguidades heterozigóticas». Editado por E. Naughton em 29abr20	L. Westwood
1.2	08May20	Atualização das Substâncias interferentes. Reeditado por E. Naughton em 08mai20	L. Westwood
1.3	13May20	Biotina adicionada à tabela de Substâncias interferentes. Detalhes de amostra de controlo adicionados à secção 1.9. Reeditado por E. Naughton em 14mai20	L. Westwood
1.4	20May20	Atualização da secção 1.4 Conteúdos do kit AlloSeq Tx e requisitos de armazenamento com as seguintes correções: 2 tubos para Tagmentation Wash Buffer, 2 tubos para Capture Wash Buffer. Reeditado por E. Naughton em 20mai20	L. Westwood
1.5	05Jun20	Foram efetuadas as seguintes alterações: - Correção de H714 na tabela de reagentes na secção 2.2, - Correção da referência à Captura híbrida na secção 3.0, - Adicionada referência a PhiX em Consumíveis - Adicionada referência aos livros de trabalho para os pontos 3.1.5 e 3.2.5. Reeditado por E. Naughton em 05jun20	L. Westwood
1.6	20out20	Foi adicionada uma nota à utilização do NaOH. Reeditado por E. Naughton em 20out20	H. Hogan
2.0	26Mar21	Distribuidor atualizado de Viena para Estocolmo na secção 8.0, de acordo com CR 2020-097. Atualização do reagente iSeq v1, que foi descontinuado e substituído por v2 na secção 7.0, de acordo com CR 2020-077. Correção de 25 para 12 ciclos de descongelamento-congelamento na secção 1.4. Reeditado por S. Antony em 09abr2021	S. Carnachan
3.0	6May21	Foi atualizado o seguinte: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Secção 1: A secção de livros de trabalho de apoio foi deslocada para a secção 9; IFU095-5 adicionado. Foi incluída uma explicação relativa aos fluxos de trabalho Original e Pooling precoce. Foi adicionado conteúdo de gene-alvo ASTX17.1(24)-B-IVD. Atualização da formatação da tabela de conteúdos do kit Tx. Adicionada referência a exsudado bucal (RUO). Correção do limite de deteção para refletir o ADN não a concentração de ADN. Foi adicionado o aviso H318 para 2N NaOH, avisos de perigo H351 e H373 para Capture Beads, aviso H351 para Hybridisation Buffer 1; foi adicionada informação de segurança do Stop Buffer à tabela.</li> <li>• Secção 2 – foi adicionada a secção Preparação de biblioteca (fluxo de trabalho Pooling precoce)</li> <li>• Secção 3 - adicionada Captura híbrida (fluxo de trabalho Pooling precoce).</li> <li>• Secção 4.1 – atualização da descrição da preparação de amostra para alinhamento com o livro de trabalho</li> <li>• Secção 4.2 – adicionados índices de Conjunto B na tabela, atualizada a estimativa de horas de 2:45 horas para 1:50 horas, alterado o passo de centrifugação de 280 x g durante 30 segundos para 100 x g durante 10 segundos no passo 9, 21f, alterado o passo de centrifugação de 280 x g durante 1 minuto para 100 x g durante 10 segundos no passo 29, alterado o passo de centrifugação de 280 x g durante 10 segundos para 100 x g durante 10 segundos, passo 36, adicionado comentário “repita a agitação de acordo com o passo 35” no passo 36</li> </ul>	S. Carnachan

Versão	Data	Modificação	Autorizado por
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Secções 4.4/5.7 – incluído esclarecimento de Largo espetro (BR) em todas as tabelas de reagente Qubit</li> <li>• Secção 5.3 - incluído comentário de esclarecimento “Fixação (não ultrapassar 18 horas a 62 °C, incluindo no passo n.º 4)” na tabela Programa de hibridação</li> <li>• Secção 5.8 - corrigidas as referências de placa/vedante TapeStation para tubo/tampas</li> <li>• Secção 6.0 - tabela removida. Esta tabela está na Secção 1.1</li> <li>• Secção 6.2 - volume total MiSeq pretendido alterado de 100 ul para 30 ul para corresponder ao livro de trabalho</li> <li>• Secção 6.4 - comentário para esclarecer que apenas 20 ul de 100 ul são carregados no iSeq</li> <li>• Secção 9 - adicionada limitação de responsabilidade “Só no fluxo de trabalho Original”, adicionado Hipoclorito de sódio (ClNaO) para lavagem pós-execução da sequenciação</li> <li>• Secção 9 - Alterados os nomes do reagente MiSeq em linha com as informações de encomenda do Illumina. Adicionado MiSeq Reagent Kit v3 (600 ciclos) para AlloSeq Tx 8, adicionado tubo Qubit e informação de encomenda de tubo/tampa/placa/película TapeStation</li> </ul> <p>Geral: Adicionado ASTX17.1(24)-B-IVD na capa Adicionado <b>“Armazene novamente após a utilização para os passos subsequentes.”</b> Recomendações para os reagentes que têm de ser retidos para os passos subsequentes, pequena formatação, correção de erros gramaticais, de pontuação e ortográficos em todo o documento. Adicionada orientação adicional para “homogeneizar por vórtice” em todas as ocorrências de utilização de Purification Beads simples no seguimento dos comentários da equipa no terreno. Corrigidas todas as ocorrências de “hybex” para “Hybex” e “QuBit” para “Qubit”. Atualização das Secções 2.2 e 4.2 na tabela relativa ao Stop Buffer e correção de “Preparação necessária” para “Nenhuma preparação necessária”. Adicionado “importado por” e o símbolo, em conformidade com a ISO 15223-1-2021 e IVDR Reeditado por L.Langley em 13 out 21</p>	
4.0	28Jan22	Correções gramaticais. Correção da declaração de limitações sobre quantificação de controlos. Correção das características de desempenho para corresponder ao folheto informativo. Foram efetuadas correções em resposta ao ZD-2445. Com base na Avaliação sumativa, os passos 8, 12 e 18 da Secção 2.3 e o passo 7 da Secção 4.3 foram atualizados com detalhes adicionais para misturar Tagmentation Beads e Purification Beads. Os conteúdos da caixa foram atualizados para refletir a configuração atualizada do kit CR2020-096 (SCN 2021-08-13).	K. Hunter
5.0	31Mar22	Foi adicionado Tx 17 (96) Conjunto A e B aos códigos do produto, conteúdo de gene-alvo, conteúdos do kit. Detalhe adicionado ao longo das Instruções de utilização para instruir acerca da utilização do índice previamente colocado na placa, nomeadamente, as secções 2.2 e 4.2. Editado por E. Naughton em 27abr22	K. Hunter
6.0	13Jun22	Foi adicionado Tx 9 (96) Conjunto A e B aos códigos do produto, conteúdo de gene-alvo e utilização prevista. ™ removido do logótipo do AlloSeq Tx. Valores de OD corrigidos nas Substâncias interferentes. Expressões alinhadas entre o livro de trabalho e as Instruções de utilização. Secção 5.2, ponto 12 ; alteração do volume de etanol de 200 µL para 800 µL. Secção 10: Adição de requisitos de comunicação de vigilância	K. Hunter