

Instrucciones de uso



LymphoTrack[®] IGHV Leader Somatic Hypermutation Assay – MiSeq[™]

Para identificar y hacer un seguimiento de los reordenamientos del gen de cadena pesada de la inmunoglobulina (*IGH*) de células B clonales usando la secuenciación masiva (SNG) con Illumina[®] MiSeq y para evaluar el grado de hipermutación somática (HS) en la secuencia del gen de cadena pesada de la variable (V) en muestras de leucemia linfocítica crónica (LLC) y linfoma linfocítico de células pequeñas (LLCP).

IVD Este ensayo se utiliza para diagnóstico *in vitro*.

Representación esquemática del locus del gen de *IGH*:



Condiciones de conservación: **-85 °C a -65 °C**
(Los controles de ADN pueden separarse de los kits de ensayo y conservarse entre 2 °C y 8 °C)

N.º de catálogo	Productos	Cantidad
REF 91210059	LymphoTrack <i>IGHV</i> Leader Somatic Hypermutation Assay Kit A – MiSeq	8 índices, 5 reacciones cada uno
REF 91210069	LymphoTrack <i>IGHV</i> Leader Somatic Hypermutation Assay Panel – MiSeq	24 índices, 5 reacciones cada uno

Índice

1.	USO PREVISTO.....	3
2.	RESUMEN Y EXPLICACION DE LA PRUEBA	3
2.1.	Antecedentes	3
2.2.	Descripción general.....	3
3.	PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO	4
3.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	4
3.2.	Purificación de amplicones.....	4
3.3.	Cuantificación de amplicones.....	4
3.4.	Secuenciación masiva (SNG).....	5
3.5.	Multiplicación de amplicones.....	5
3.6.	Evaluación de la hipermutación somática (HS) de <i>IGHV</i>	5
4.	REACTIVOS.....	6
4.1.	Componentes de los reactivos	6
4.2.	Advertencias y precauciones.....	7
4.3.	Almacenamiento y manipulación.....	7
5.	INSTRUMENTAL	8
5.1.	Termociclador.....	8
5.2.	Soporte magnético	8
5.3.	Instrumento de PCR en tiempo real	8
5.4.	Instrumento Illumina MiSeq.....	8
6.	RECOGIDA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS	9
6.1.	Precauciones	9
6.2.	Sustancias que pueden interferir	9
6.3.	Requisitos y manipulación de las muestras.....	9
6.4.	Almacenamiento de la muestra	9
7.	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	10
7.1.	Materiales suministrados	10
7.2.	Materiales necesarios (no suministrados).....	10
7.3.	Preparación de los reactivos	11
7.4.	Amplificación.....	11
7.5.	Purificación con AMPure XP	11
7.6.	Cuantificación de amplicones.....	13
7.7.	Combinación y cuantificación de la genoteca	14
7.8.	Dilución de la genoteca combinada.....	14
7.9.	Configuración de qPCR para la cuantificación de genotecas.....	14
7.10.	Preparación de la genoteca para la carrera de secuenciación de MiSeq	14
7.11.	Carga de la Flow Cell (Celda de flujo) de MiSeq	15
7.12.	Configuración de la Sample Sheet (Hoja de muestras) de MiSeq.....	16
7.13.	Inicio de la serie de MiSeq.....	17
8.	ANALISIS DE DATOS	17
9.	ESPECIFICACIONES DEL ENSAYO	17
10.	LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	17
11.	INTERPRETACION Y ELABORACION DE INFORMES	18
12.	DATOS DE MUESTRA	22
13.	CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO	23
14.	GUIA DE RESOLUCION DE PROBLEMAS	24
15.	SERVICIO TECNICO Y ATENCION AL CLIENTE	25
16.	REFERENCIAS	25
17.	SIMBOLOS.....	25
18.	AVISO LEGAL.....	26
19.	LYMPHOTRACK Dx <i>IGHV</i> LEADER SOMATIC HYPERMUTATION ASSAY – MiSEQ: GUIA SINTETICA	27
20.	ANEXO A: CREACION DE UNA GENOTECA DE SECUENCIACION CON VARIAS DIANAS SNG	28

1. Uso previsto

El ensayo LymphoTrack Dx *IGHV* Leader Somatic Hypermutation para Illumina MiSeq es un producto de diagnóstico *in vitro* diseñado para la determinación por secuenciación masiva (SNG) de la distribución de frecuencia de reordenamientos del gen *IGH*, así como del grado de hipermutación somática de los genes reordenados, en pacientes con posible neoplasia linfoproliferativa. Este ensayo resulta útil para identificar neoplasias linfoproliferativas y para determinar el pronóstico de la enfermedad.

2. Resumen y explicación de la prueba

2.1. Antecedentes

El locus del gen de cadena pesada de la inmunoglobulina (*IGH*), situado en el cromosoma 14 (14q32.3), abarca 46-52 segmentos de genes variables funcionales y 30 no funcionales (V_H), 27 segmentos de genes de diversidad funcional (D_H) y 6 segmentos de genes de unión funcional (J_H), repartidos entre 1250 kilobases. Los segmentos génicos V_H contienen tres marcos (FR) y dos regiones determinantes de la complementariedad (CDR) variables.

Las células linfoides son distintas del resto de células somáticas del organismo. Durante el desarrollo, los genes del receptor de antígenos de las células linfoides se someten a un reordenamiento somático.¹ Durante el desarrollo de los linfocitos B, por ejemplo, los genes que codifican las moléculas de *IGH* se ensamblan a partir de múltiples segmentos de genes polimórficos que se someten a reordenamiento y selección, lo que da lugar a combinaciones $V_H-D_H-J_H$ únicas tanto en longitud como en secuencia. Dado que las leucemias y los linfomas se originan a partir de la transformación maligna de células linfoides individuales, las células leucémicas o linfómicas de una persona por lo general comparten uno o más reordenamientos del gen del receptor de antígenos específico de célula o "clonal". Por lo tanto, las pruebas de detección de reordenamientos clonales de *IGH* resultan útiles para estudiar neoplasias de los linfocitos B y T.

Por otro lado, el estado de hipermutación de los genes de la región variable de cadena pesada de la inmunoglobulina (*IGHV*) suministra importante información de pronóstico para los pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) y linfoma linfocítico de células pequeñas (LLCP). Existe hipermutación somática (HS) de *IGHV* cuando la diferencia con la secuencia del gen V_H de la línea germinal es mayor o igual que el 2 %. Por el contrario, se considera que no hay signos de hipermutación somática cuando la diferencia es menor que el 2 %. El estado de hipermutación somática de los clones es clínicamente significativo para la LLC-B, ya que existe una diferencia clara entre la mediana de la supervivencia de los pacientes con hipermutación somática y sin ella. La hipermutación en la región *IGHV* representa un buen factor pronóstico, mientras que la ausencia de mutación indica un mal pronóstico.²

Al principio, los reordenamientos clonales se identificaban mediante la técnica de restricción de fragmentos e hibridación por Southern blot (RF-SBH). Sin embargo, estas pruebas resultaban engorrosas y laboriosas, necesitaban grandes cantidades de ADN y no eran adecuadas para el análisis de muchos de los locus de receptores de antígeno menos diversos.

A lo largo de las últimas décadas, la técnica RF-SBH se ha visto reemplazada por la prueba de clonalidad mediante PCR, desarrollada por Alexander Morley³ y que se considera el método de referencia en la actualidad. Estos ensayos identifican la clonalidad mediante la sobrerrepresentación de reordenamientos del gen $V_H-D_H-J_H$ amplificado (o productos D_H-J_H incompletos) después de su separación y a través de electroforesis capilar o en gel. A pesar de su sensibilidad e idoneidad para probar pequeñas cantidades de ADN, estos ensayos no distinguen con facilidad entre poblaciones clonales y reordenamientos múltiples bajo un pico único, ni se han diseñado para identificar la secuencia de ADN V_H-J_H específica, necesaria para hacer un seguimiento de poblaciones clonales en análisis posteriores. Esta segunda limitación puede revestir cierta importancia, pues una vez identificada la secuencia de ADN clonal específica, esta puede usarse en pruebas posteriores para hacer un seguimiento de dichas poblaciones celulares clonales.

2.2. Descripción general

LymphoTrack Dx *IGHV* Leader Somatic Hypermutation Assay – MiSeq representa una mejora significativa con respecto a los ensayos de clonalidad existentes que usan análisis de fragmentos, ya que detecta los reordenamientos del gen *IGH* a través de una única mezcla maestra múltiple e identifica la secuencia de ADN específica para cada reordenamiento del gen clonal. En consecuencia, este ensayo tiene tres usos importantes y complementarios: proporciona información esencial sobre la presencia de clonalidad, identifica la información secuencial necesaria para hacer un seguimiento de dichos clones en muestras posteriores y proporciona la información de secuenciación necesaria para calcular el grado de HS.

Cada mezcla maestra multiplicada única se dirige a una región del gen líder (VHL) y de unión (J) de *IGH*. Los cebadores incluidos en las mezclas maestras se han diseñado con adaptadores de Illumina (hasta 24 índices distintos). Este método posibilita la ejecución de la PCR de un solo paso y el agrupamiento de amplicones de distintas muestras y dianas (generados a partir de otros ensayos LymphoTrack Dx para el instrumento Illumina MiSeq) en una única celda de flujo de MiSeq, lo que permite analizar en paralelo hasta 24 muestras por diana en una sola serie.

El LymphoTrack Dx Software – MiSeq asociado ofrece un método simple y optimizado para el análisis y visualización de datos. Si se siguen las pautas proporcionadas en el apartado 11 *Interpretación y elaboración de informes*, los resultados de la muestra resumidos en el software pueden interpretarse fácilmente en cuanto a la presencia o ausencia de clonalidad y de hipermutación somática.

Los resultados de las pruebas de clonalidad molecular siempre deben interpretarse en el contexto de los datos clínicos, histológicos e inmunofenotípicos disponibles.

El kit incluye controles positivo y negativo de clonalidad y un control positivo de hipermutación somática.

Nota: Para obtener una explicación más detallada del locus y la estrategia de secuenciación dirigida, consulte Miller, J. E., 2013.⁴

3. Principios del procedimiento

3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las pruebas basadas en la PCR se usan de forma habitual para identificar poblaciones clonales de linfocitos B y T. Estos ensayos amplifican el ADN entre cebadores dirigidos a las regiones conservadas V y J de los genes del receptor de antígenos. Los cebadores se dirigen a regiones conservadas que se encuentran a ambos lados de la zona en la que se producen los reordenamientos génicos programados durante la maduración de los linfocitos B y T. Como consecuencia de estos reordenamientos génicos, se producen diferentes poblaciones de linfocitos B y T.

Los genes del receptor de antígenos que se someten a reordenamiento son cadenas pesadas de la inmunoglobulina (*IGH*), locus de cadenas ligeras (*IGK* e *IGL*) en linfocitos B y locus de los genes del receptor de linfocitos T (*TRA*, *TRB*, *TRG* y *TRD*) en linfocitos T. Cada linfocito B y T presenta uno o dos reordenamientos V-J productivos, que son únicos en longitud y secuencia. Por lo tanto, cuando se amplifica el ADN de una población normal o policlonal con cebadores de ADN que flanquean la región V-J, se generan amplicones únicos tanto en secuencia como en longitud, lo que refleja una población heterogénea. En caso de ausencia de ADN de los linfocitos, no se generan amplicones. Las muestras que contienen poblaciones clonales de *IGH* generan uno o dos productos amplificados prominentes de la misma longitud y secuencia que los que se detectan con una frecuencia significativa en un fondo policlonal disminuido.

3.2. Purificación de amplicones

Los amplicones derivados de la PCR se purifican por medio de microesferas paramagnéticas de inmovilización reversible de la fase sólida (SPRI), que eliminan el exceso de cebadores, nucleótidos, sales y enzimas para obtener una purificación de alto rendimiento de los amplicones de la PCR. Los productos derivados de la PCR con un mínimo de 100 pb se fijan selectivamente a las microesferas paramagnéticas mediante una solución tampón optimizada, mientras que los contaminantes —exceso de cebadores, dímeros de primers, sales y dNTP no incorporados— se eliminan por lavado. A continuación, los amplicones se eluyen y se separan de las microesferas paramagnéticas, lo que da lugar a un producto de la PCR más purificado para el análisis posterior y la cuantificación de amplicones.

3.3. Cuantificación de amplicones

Los amplicones purificados se cuantifican utilizando los kits Library Quantification (Cuantificación de genotecas) KAPA™ para plataformas Illumina. Los amplicones de la PCR purificados y diluidos, y un conjunto de seis patrones de ADN previamente diluidos, se amplifican mediante métodos cuantitativos (qPCR), utilizando la mezcla maestra y los cebadores de qPCR SYBR® FAST de KAPA. Los cebadores del kit KAPA se dirigen a las secuencias de oligonucleótidos de los adaptadores de las celdas de flujo P5 y P7 de Illumina.

La puntuación Ct promedio para los patrones de ADN previamente diluidos se traza frente a log10 para generar una curva estándar, que luego se puede usar para calcular la concentración (pM) de amplicones de PCR obtenidos del ADN de la muestra. El cálculo de la concentración de amplicones de PCR posibilita una representación igual de los amplicones en la genoteca combinada final que se carga en MiSeq para la secuenciación.

3.4. Secuenciación masiva (SNG)

Los métodos de secuenciación de Sanger son los más habituales en las tecnologías de secuenciación de ácido nucleico de “primera generación”. Los métodos más novedosos, que se valen de enfoques de secuenciación masiva en paralelo, se conocen como SNG. Estas tecnologías usan distintas estrategias de preparación, secuenciación, obtención de imágenes y bioinformática para la alineación y el ensamblaje del genoma.

Las tecnologías de SNG empleadas en este ensayo se basan en la amplificación de secuencias genéticas que utilizan una serie de cebadores directos e inversos con etiquetas de índice y de adaptador. Los amplicones generados con las mezclas maestras de LymphoTrack Dx se cuantifican, agrupan y cargan en una celda de flujo para secuenciarlos con una plataforma de secuenciación Illumina MiSeq. En concreto, los productos amplificados de la genoteca se hibridan con oligonucleótidos en una celda de flujo y se amplifican para formar colonias clonales locales (amplificación puente). Se añaden cuatro tipos de bases de terminador reversible (bases TR) y la cadena de ADN de la secuenciación se amplía un nucleótido cada vez. Para registrar la incorporación de nucleótidos, una cámara CCD toma una imagen de la luz emitida al agregar cada base TR y, a continuación, se escinde para poder incorporar la base siguiente. Se agrega un bloqueador terminal 3' después de cada ciclo del proceso de secuenciación y se eliminan los nucleótidos no incorporados antes de añadir cuatro nuevas bases TR.

3.5. Multiplicación de amplicones

Este ensayo se diseñó para permitir dos niveles de multiplicación distintos, con el fin de reducir costes y ahorrar tiempo a los laboratorios. El primer nivel de multiplicación proviene de los diversos índices que se suministran con los ensayos. Cada uno de estos 24 índices actúa como un código de barras exclusivo que permite agrupar los amplicones de muestras individuales después de la amplificación mediante PCR para generar la genoteca de secuenciación; las secuencias resultantes se clasifican mediante un software de bioinformática que identifica las que se han originado a partir de una muestra individual.

El segundo nivel de multiplicación proviene de la capacidad del software para ordenar los datos de secuenciación por índice y diana. Esto permite que los amplicones generados con cebadores específicos (incluso aquellos marcados con el mismo índice) se agrupen para generar la genoteca que se secuenciará en una celda de flujo individual. Un ejemplo sería secuenciar conjuntamente una combinación de productos de varios kits de ensayo Invivoscribe LymphoTrack Dx para MiSeq, como *IGHV Leader*, *IGH FR1*, *IGH FR2*, *IGH FR3*, *IGK*, *TRB* y *TRG*. **Es importante usar la bioquímica de secuenciación adecuada cuando se multiplican amplicones de diferentes dianas génicas. El número de ciclos de secuenciación debe ser suficiente como para secuenciar el amplicón de mayor tamaño de la multiplicación.** Por ejemplo, al multiplicar conjuntamente una combinación de amplicones de *IGH FR1*, *IGH FR2*, *IGH FR3*, *IGK*, *TRB* y *TRG*, utilice el kit de secuenciación MiSeq v2 (500 ciclos) para un máximo de 4 dianas o MiSeq v3 (600 ciclos) para un máximo de 7 dianas. Al multiplicar cualquiera de estos amplicones juntos con *IGHV Leader*, utilice el kit de secuenciación MiSeq v3 (600 ciclos). Si multiplica conjuntamente solo amplicones *IGH FR3* y *TRG*, ambos con un tamaño de amplicón más corto, utilice el kit de secuenciación MiSeq v2 (300 o 500 ciclos) y ajuste la configuración del ciclo en la hoja de muestras. Para obtener más instrucciones, consulte el *Anexo A: Creación de una genoteca de secuenciación con varias dianas SNG* (apartado 20).

El número de muestras que se pueden multiplicar en una celda de flujo individual también depende de la celda de flujo utilizada. Las celdas de flujo estándar de Illumina (MiSeq v3) pueden generar 22-25 millones de lecturas. Para determinar el número de lecturas por muestra, divida el número total de lecturas de la celda de flujo entre el número de muestras que se van a multiplicar; el número de lecturas por cada muestra será suficiente para una interpretación válida. Para obtener más información, consulte el apartado 11 *Interpretación y elaboración de informes*. Illumina también fabrica otras celdas de flujo que utilizan la misma bioquímica de secuenciación, pero que generan menos lecturas. **Si se usan estas celdas de flujo alternativas, hay que tener en cuenta que un número menor de lecturas totales significa menos profundidad por muestra, o que se pueden procesar menos muestras en la celda de flujo para obtener la misma profundidad por muestra.**

3.6. Evaluación de la hipermutación somática (HS) de *IGHV*

Tras el análisis del estado de hipermutación somática, el software de bioinformática indicará la tasa de mutación en función del porcentaje de discordancia entre amplicones clonales y genes de referencia de la línea germinal; una predicción de si la traducción de la proteína se ajustará o no al marco; una predicción de si las mutaciones o reordenamientos génicos darán lugar a un codón de terminación prematuro; y el porcentaje de cobertura del gen V_H en la región diana.

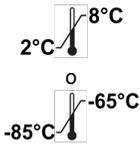
4. Reactivos

4.1. Componentes de los reactivos

Tabla 1. Kits disponibles

N.º de catálogo	Descripción	N.º de mezclas maestras indexadas	Reacciones totales
 91210059	LymphoTrack Dx <i>IGHV</i> Leader Somatic Hypermutation Assay Kit A – MiSeq	8 índices, 5 carreras de secuenciación cada uno	40
 91210069	LymphoTrack Dx <i>IGHV</i> Leader Somatic Hypermutation Assay Panel – MiSeq	24 índices, 5 carreras de secuenciación cada uno	120

Tabla 2. Componentes del kit

Reactivo	Componentes del reactivo	Cantidad por unidad	N.º de unidades de 91210059	N.º de unidades de 91210069	Temperatura de almacenamiento	Notas
Mezclas maestras[‡]	<i>IGH</i> Leader MiSeq 01	250 µL	1	1		N. P.
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 02		1	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 03		1	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 04		1	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 05		1	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 06		1	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 07		1	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 08		1	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 09		0	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 10		0	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 11		0	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 12		0	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 13		0	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 14		0	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 15		0	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 16		0	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 18		0	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 19		0	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 20		0	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 21		0	1		
	<i>IGH</i> Leader MiSeq 22		0	1		
<i>IGH</i> Leader MiSeq 23	0	1				
<i>IGH</i> Leader MiSeq 25	0	1				
<i>IGH</i> Leader MiSeq 27	0	1				
ADN de control positivo[‡]	<i>IGH</i> HS POS (+)  40880008	45 µL	1	3		ADN de <i>IGH</i> V4-59_08/ <i>IGH</i> J4_02 en ADN de amígdala con una tasa de mutación ≥ 2 % frente a la secuencia de la línea germinal
	<i>IGH</i> POS (+)  40880009	45 µL	1	3		ADN de <i>IGH</i> V1-46_03/ <i>IGH</i> J4_02 en ADN de amígdala
ADN de control negativo	SNG NEG (-)  40920018	45 µL	1	3		ADN de amígdala; la frecuencia secuencial más alta puede variar entre lotes

Nota: En la fabricación de estos kits no se usan conservantes.

‡Nota: En estos kits no se usan los índices 17, 24 y 26.

***Nota:** Aunque el ADN de control positivo de *IGH* es positivo para la clonalidad en el locus de *IGH*, no es positivo para la presencia de hipermutación somática. El ADN de control positivo para la tasa de hipermutación somática de *IGH* se ha descrito como positivo para la hipermutación somática en el locus de *IGH*.

4.2. Advertencias y precauciones



Lea atentamente las instrucciones de uso antes de comenzar el procedimiento de ensayo y siga cada paso atentamente.

- **IVD** Producto para uso diagnóstico *in vitro*.
- Utilice este kit de ensayo como un conjunto. No utilice los reactivos de otros fabricantes. La dilución, la reducción de las reacciones de amplificación o cualquier otra alteración del protocolo puede afectar al rendimiento de la prueba y anular cualquier sublicencia limitada derivada de la adquisición de estos kits.
- Los materiales son estables hasta la fecha de caducidad indicada si se almacenan y manipulan según las instrucciones. No utilice los kits después de su fecha de caducidad.
- El estricto cumplimiento del protocolo garantiza un rendimiento y una reproducibilidad óptimos. Asegúrese de usar los programas de termociclador correctos, ya que otros programas pueden generar datos imprecisos o erróneos, como falsos positivos y falsos negativos.
- No mezcle ni combine reactivos de kits con diferentes números de lote.
- Elimine los reactivos no utilizados y los residuos de acuerdo con las regulaciones nacionales, federales, estatales y locales.
- Utilice equipos de protección personal estándar (guantes, batas de laboratorio y gafas protectoras) para realizar las tareas de laboratorio. Siga las prácticas óptimas de laboratorio y tome las precauciones necesarias cuando trabaje con muestras. No pipetee con la boca. No coma, beba ni fume en las zonas de trabajo del laboratorio. Lávese bien las manos después de manipular las muestras y los reactivos del kit de ensayo. Manipule las muestras en instalaciones aprobadas de contención de seguridad biológica y ábralas solo en campanas de seguridad biológica certificadas.
- Utilice agua para uso en biología molecular al preparar el ADN de la muestra.
- Dado que se trata de una prueba de gran sensibilidad analítica, debe ser extremadamente cauteloso para evitar la contaminación de los reactivos o mezclas de amplificación con muestras, material de referencia o material amplificado. Use puntas de pipeta nuevas y resistentes a aerosoles entre muestras y entre reactivos de dispensación. Todos los reactivos deben controlarse atentamente para detectar signos de contaminación (p. ej., controles negativos que den señales positivas). Elimine cualquier reactivo que pueda haberse contaminado.
- Para reducir al mínimo la posibilidad de contaminación, use guantes para manipular las muestras y los reactivos y limpie las zonas de trabajo y las pipetas antes de configurar la PCR.
- En el laboratorio de PCR, siga una secuencia de trabajo unidireccional entre las distintas zonas de trabajo: comience con la preparación de mezclas maestras, continúe con la preparación de las muestras, luego con la amplificación y finalmente con la detección. El autoclave no elimina la contaminación del ADN. No lleve ADN amplificado a las zonas designadas para mezclas maestras o preparación de las muestras.
- Las pipetas, puntas de pipeta y cualquier otro instrumento utilizado en una zona específica deben ser para uso exclusivo en dicha zona.
- Descontamine los elementos no desechables con lejía al 10 % y aclárelos con agua destilada dos veces por separado antes de devolverlos a las zonas de inicio.
- Siempre que sea posible, utilice material plástico estéril desechable para evitar la contaminación.

4.3. Almacenamiento y manipulación

- Si el ensayo no se va a utilizar de inmediato, almacénelo entre -85 °C y -65 °C.
- La temperatura óptima de almacenamiento de los controles de ADN es entre 2 °C y 8 °C, pero el ADN también se puede almacenar entre -85 °C y -65 °C.
- Los reactivos y controles deben descongelarse y mezclarse en un agitador vortex antes de su uso para garantizar una resuspensión completa.
- Debido a las altas concentraciones de sal, las mezclas maestras de PCR son sensibles a los ciclos de congelación/descongelación. Limite el número de ciclos a un máximo de cuatro.

Si tiene alguna duda, póngase en contacto con el personal técnico de Invivoscribe. Estaremos encantados de ayudarle a determinar sus necesidades óptimas de almacenamiento.

5. Instrumental

Se recomiendan los instrumentos específicos indicados a continuación de acuerdo con los métodos utilizados para validar este ensayo.

5.1. Termociclador

- Uso o función: amplificación de muestras de ADN
- Instrumento recomendado: Thermal Cycler (Termociclador) Veriti™ Dx o equivalente
- Características de rendimiento y especificaciones:
 - Intervalo térmico mínimo: entre 15 °C y 96 °C
 - Velocidad mínima de rampa: 0,8 °C/s
- Siga los procedimientos de instalación, uso, calibración y mantenimiento del fabricante.
- Consulte el apartado 7.4 *Amplificación* para obtener información sobre el programa del termociclador.

5.2. Soporte magnético

- Uso o función: purificación de productos para PCR
- Instrumento recomendado:
 - Magnetic Stand 96* (Soporte magnético 96) Ambion® (REF AM10027)
 - 96 Ring Super Magnet Plate* (Superplaca magnética con anillo 96) Agencourt SPRIPlate® (REF A32782)
 - 96 Side Skirted Magnet* (Imán con faldón lateral 96) Thermo Fisher Scientific DynaMag™ (REF 12027) o equivalente
- Características de rendimiento y especificaciones:
 - Microesferas paramagnéticas de precipitado
- Consulte el apartado 7.5 *Purificación con AMPure XP* para conocer los métodos de purificación de los productos para PCR.

5.3. Instrumento de PCR en tiempo real

- Uso o función: cuantificación de productos para PCR purificados
- Instrumento recomendado: Fast Dx Real-Time PCR (PCR en tiempo real Fast Dx) Applied Biosystems® 7500 o equivalente
- Características de rendimiento y especificaciones:
 - Puede detectar la longitud de onda de SYBR Green
- Siga los procedimientos de instalación, uso, calibración y mantenimiento del fabricante.
- Consulte el apartado 7.6 *Cuantificación de amplicones* para obtener información sobre el programa de PCR en tiempo real.

5.4. Instrumento Illumina MiSeq

- Uso o función: genoteca de ADN normalizada por secuencia
- Características de rendimiento y especificaciones:
 - Compatible con Reagent Kit v3* de MiSeq
- Siga los procedimientos de instalación, uso, calibración y mantenimiento del fabricante.
- Consulte los apartados 7.11 *Carga de la Flow Cell (Celda de flujo)* de MiSeq, 7.12 *Configuración de la Sample Sheet (Hoja de muestras) de MiSeq* y 7.13 *Inicio de la serie de MiSeq* para conocer los parámetros aplicables a MiSeq.

*Advertencia: Estos productos no poseen el marcado CE.

6. Recogida y preparación de las muestras

6.1. Precauciones

Las muestras biológicas procedentes de seres humanos pueden contener materiales potencialmente infecciosos. Manipule las muestras de acuerdo con el programa sobre patógenos de transmisión hemática de su centro y de acuerdo con un nivel de bioseguridad 2.

6.2. Sustancias que pueden interferir

Se sabe que las siguientes sustancias interfieren con la PCR:

- Quelantes de cationes divalentes
- Puntas de pipeta de baja retención
- EDTA (no significativo en concentraciones bajas)
- Heparina

6.3. Requisitos y manipulación de las muestras

- La cantidad mínima empleada es de 50 ng de ADN de alta calidad (5 μL de ADN de la muestra a una concentración mínima de 10 ng/ μL).
- Este ensayo permite probar ADN genómico extraído y purificado. El ADN debe cuantificarse de acuerdo con un método específico para ADN bicatenario (ADNbc) y debe estar exento de inhibidores de la PCR.
- Resuspenda el ADN en una solución tampón como 0,1X TE (Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0, preparada con agua para uso en biología molecular) o en agua para uso en biología molecular.

6.4. Almacenamiento de la muestra

El método de conservación de las muestras debe garantizar la ausencia de degradación del ADN.

7. Procedimiento de ensayo

7.1. Materiales suministrados

Consulte la Tabla 2 para saber qué materiales se suministran.

7.2. Materiales necesarios (no suministrados)

Tabla 3. Materiales necesarios (no suministrados)

Reactivo/material	Reactivos/proveedores obligatorios o recomendables	N.º de catálogo	Notas
ADN polimerasa	Roche: <ul style="list-style-type: none"> DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq™ o Invivoscribe: <ul style="list-style-type: none"> DNA Polymerase (ADN polimerasa) FalconTaq o equivalente 	05206944190 o 60970130	5 U/μL
Agua para uso en biología molecular	N. P.	N. P.	Exenta de DNasa y RNasa
Pipetas calibradas	N. P.	N. P.	Deben ser capaces de medir con precisión volúmenes entre 0,2 μL y 1000 μL
Placas o tubos para PCR	N. P.	N. P.	Exentas de inhibidores de DNasa, RNasa y PCR
Puntas de pipeta con barrera de filtro	N. P.	N. P.	Estériles y exentas de RNasa, DNasa y pirógenos
Tubos de microcentrífuga	N. P.	N. P.	Estériles
Kit de purificación de PCR	Beckman Coulter, Inc: <ul style="list-style-type: none"> Agencourt AMPure XP 	A63880	N. P.
Purificación de PCR	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Magnetic Stand 96 (Soporte magnético 96) Ambion o 96 Side Skirted Magnet (Imán con faldón lateral 96) DynaMag o Beckman Coulter: <ul style="list-style-type: none"> 96 Ring Super Magnet Plate (Superplaca magnética con anillo 96) Agencourt SPRIPlate o equivalente 	AM10027 o 12027 o A32782	N. P.
Cuantificación de amplicones y genotecas	KAPA Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> Library Quantification Kit (Kit de cuantificación de genotecas) KAPA – Illumina 	KK4824	N. P.
Serie de MiSeq	Illumina: <ul style="list-style-type: none"> Reagent v3 kit (Kit de reactivos v3) de MiSeq (600 ciclos) 	MS-102-3003	Celda de flujo estándar
Software de MiSeq	<ul style="list-style-type: none"> Control Software (Software de control) de MiSeq v2.6 o posterior Local Run Manager v2.0 o posterior 	N. P.	N. P.
Solución tampón de dilución A	N. P.	N. P.	Prepare una solución de Tris-HCl de 10 mM, pH 8,0 + Tween 20 al 0,05 %

7.3. Preparación de los reactivos

A fin de asegurarse de que las muestras de ADN no contengan inhibidores de la PCR y sean suficientes, tanto en calidad como en cantidad, para generar un resultado válido, analícelas con Specimen Control Size Ladder Master Mix (Mezcla maestra de escalera de tamaño de control de muestras) de Invivoscribe ([REF](#) 20960021 para detección por ABI o [REF](#) 20960020 para detección por gel). Specimen Control Size Ladder (Escalera de tamaño de control de muestras) tiene como diana numerosos genes y genera una serie de amplicones de 100, 200, 300, 400 y 600 pb; el tamaño puede variar +/- 5 pb debido al estándar de tamaño y/o a las diferencias entre instrumentos. La verificación de la integridad del ADN es especialmente importante para muestras más complejas, *p.ej.*, tejidos FFPE.

Utilice siempre los controles positivo y negativo para garantizar que el análisis se realiza correctamente.

Configure siempre un control blanco (CB) para asegurarse de que no haya contaminación durante el proceso de configuración de la PCR.

- 7.3.1. Use guantes para sacar las mezclas maestras del congelador. Deje que los tubos se descongelen. A continuación, mézclelos suavemente en el agitador vortex y centrifugue brevemente.
- 7.3.2. Encienda la campana de contención o cabina sin circulación de aire y pipetee 45 µL de cada tubo de mezcla de reacción en una placa para PCR limpia (un pocillo por mezcla maestra y una mezcla maestra por muestra).
 - Incorpore dos controles a cada serie (uno positivo y uno negativo) y un CB.
 - Por lo que respecta al CB, utilice agua para uso en biología molecular en lugar de ADN.
- 7.3.3. Añada 0,2 µL de ADN Taq polimerasa (5 U/µL) a los pocillos con las alícuotas de las mezclas maestras.
- 7.3.4. Añada 5 µL de ADN de la muestra (con una concentración mínima de 10 ng/µL), ADN de control o agua para uso en biología molecular (CB) a los pocillos individuales con las reacciones de mezcla maestra respectiva.
 - Pipetee arriba y abajo de 5 a 10 veces para mezclar.
 - Cierre la placa e introdúzcala en el termociclador de PCR.

Tabla 4. Configuración de la reacción

Reactivo	Volumen
Mezcla maestra	45,0 µL
ADN Taq polimerasa	0,2 µL
ADN de muestra o control	5,0 µL
Volumen total	50,2 µL

7.4. Amplificación

- 7.4.1. Amplifique las muestras mediante el programa de PCR de la Tabla 5.

Si está multiplicando varias dianas, consulte el Anexo A (apartado 20) para obtener más información sobre otras condiciones de termociclado de LymphoTrack Dx Assay – MiSeq.

Tabla 5. Programa de PCR

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclo
1	95 °C	7 minutos	1
2	95 °C	45 segundos	32x
3	60 °C	45 segundos	
4	72 °C	90 segundos	
5	72 °C	10 minutos	1
6	15 °C	∞	1

Nota: Caliente la tapa a 105 °C y ajuste el volumen de reacción a 50 µL.

- 7.4.2. Cuando el programa de amplificación termine, extraiga la placa para PCR del termociclador. Si no va a continuar con el proceso de inmediato, conserve los productos de la PCR a 4 °C durante 1 día.

7.5. Purificación con AMPure XP

La purificación de los productos de la PCR —derivados de las muestras y los controles positivos, negativos o en blanco— se realizó durante la validación del ensayo mediante el sistema de purificación para PCR Agencourt AMPure XP.

Preparación:

- 7.5.1. Extraiga el reactivo AMPure XP del espacio de conservación y deje que se ajuste a la temperatura ambiente antes de usarlo. Agite suavemente el frasco de Agencourt AMPure XP para resuspender las partículas magnéticas que puedan haberse asentado.

Si está multiplicando varias dianas, consulte el Anexo A (apartado 20) para obtener más información sobre los volúmenes del reactivo AMPure XP usados en otros productos de PCR de LymphoTrack Dx Assay – MiSeq.

- 7.5.2. Transfiera el volumen necesario del reactivo Agencourt AMPure XP para la placa a un tubo de 2 mL nuevo a fin de reducir al mínimo el riesgo de contaminación por las puntas de pipeta.
- Volumen necesario del reactivo Agencourt AMPure XP = $n \times 50 \mu\text{L}$ (siendo n el número de muestras que se desean purificar).
- 7.5.3. Prepare una solución matriz (0,5 mL por cada muestra que se desee purificar) de etanol al 80 % y agua estéril.

Fijación de amplicones a partículas magnéticas:

- 7.5.4. Añada 50 μL de alícuota del reactivo Agencourt AMPure XP **a temperatura ambiente** a cada muestra que desee purificar.
- Pipetee arriba y abajo 10 veces para mezclar.
 - El color debe ser homogéneo tras la mezcla.
 - Incube 10 minutos a temperatura ambiente.
- 7.5.5. Coloque las muestras mezcladas en el 96 Side Skirted Magnet (Imán con faldón lateral 96) DynaMag o el Magnetic Stand-96 (Soporte magnético 96) Ambion e incube a temperatura ambiente durante 5 minutos para que las partículas magnéticas se separen de la solución.
- Mantenga la placa en el soporte magnético en todo momento a lo largo del procedimiento hasta llegar al paso 7.5.10.
- 7.5.6. Utilice una pipeta P200 (o una pipeta multicanal similar) ajustada en 95 μL para aspirar el sobrenadante aclarado y deséchelo.
- Utilice una pipeta P10 (o una pipeta multicanal similar) ajustada en 10 μL para eliminar el exceso de sobrenadante.
 - No elimine las partículas magnéticas.

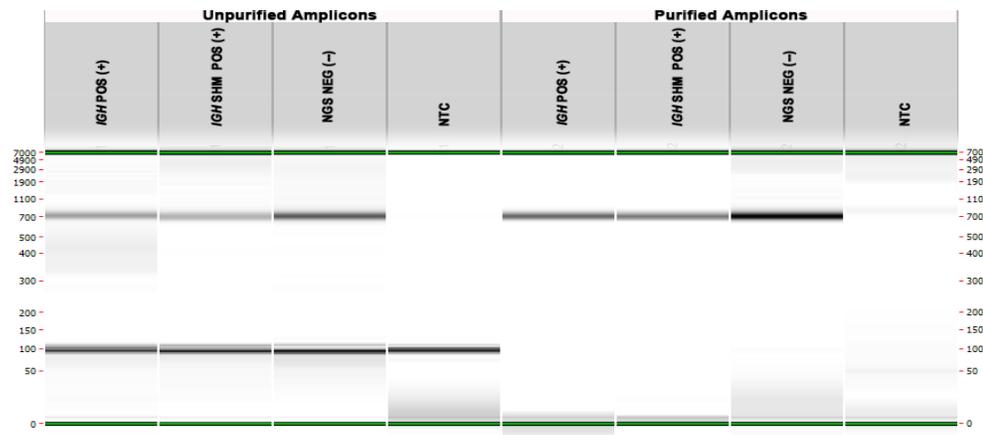
Lavado:

- 7.5.7. Sin retirar la placa del soporte magnético, añada 200 μL de etanol al 80 % a cada muestra. Incube durante 30 segundos a temperatura ambiente.
- Utilice una pipeta P200 (o una pipeta multicanal similar) ajustada en 195 μL para aspirar el etanol y deséchelo.
 - Utilice una pipeta P10 (o una pipeta multicanal similar) ajustada en 10 μL para eliminar el exceso de etanol.
 - No elimine las partículas magnéticas.
- 7.5.8. Repita las instrucciones que figuran en el apartado 7.5.7 hasta completar dos lavados.
- 7.5.9. Asegúrese de no retirar la placa del soporte magnético y deje que las partículas magnéticas se sequen al aire durante 5 minutos.

Elución:

- 7.5.10. Retire la placa del soporte magnético. Añada 25 μL de la solución tampón de Tris-HCl, 10 mm, pH 8,0.
- Mezcle con la pipeta hasta obtener una mezcla homogénea.
 - Asegúrese de que todas las partículas magnéticas se encuentren en la solución.
- 7.5.11. Incube a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 7.5.12. Coloque la placa en el soporte magnético durante 5 minutos o hasta que el sobrenadante se haya aclarado.
- 7.5.13. Transfiera 22 μL del eluido a una placa nueva. Selle con cintas de tapa. Etiquete la placa y centrifugue brevemente para asegurarse de que el sobrenadante se asiente completamente en el fondo del pocillo. Conserve a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o proceda con el paso siguiente.
- La imagen de gel de la Figura 1 ilustra la eficacia de una purificación normal (se muestran los amplicones antes y después de la purificación).

Figura 1: Ejemplo del resultado de purificación de amplicones de las mezclas maestras de LymphoTrack Dx IGHV Leader Somatic Hypermutation Assay – MiSeq. La imagen se generó tras el procesamiento de productos no purificados y purificados en LabChip GX.



7.6. Cuantificación de amplicones

Los siguientes pasos se realizaron durante la validación del ensayo para cuantificar los amplicones de PCR purificados generados a partir de muestras, así como de controles positivos, negativos y blancos, con el Library Quantification Kit (Kit de cuantificación de genotecas) KAPA (KAPA Biosystems).

7.6.1. Dilución de amplicones

La solución tampón A a la que se hace referencia a continuación es: Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0 + Tween 20 al 0,05 %

1:4000 Final:

Paso A: 2 µL de eluido de amplicón purificado + 198 µL de solución tampón A.
Pipetee arriba y abajo 10 veces para mezclar bien.

Paso B: 5 µL del paso A + 195 µL de solución tampón A.
Pipetee arriba y abajo 10 veces para mezclar bien.

7.6.2. Prepare un análisis qPCR para la cuantificación de los amplicones siguiendo la Tabla 6 en cada reacción (consulte las instrucciones del kit de cuantificación de genotecas KAPA para obtener más detalles):

Tabla 6. Preparación de qPCR

Reactivo	Volumen
Agua de calidad PCR	3,6 µL
Mezcla maestra SYBR FAST qPCR (qPCR rápida) KAPA con cebador Premix	12,0 µL
ROX	0,4 µL
Amplicones diluidos o patrón (1-6)	4,0 µL
Volumen total	20,0 µL

7.6.3. Siga la Tabla 7 para determinar el programa térmico de qPCR.

Tabla 7. Programa de qPCR

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclo
1	95 °C	5 minutos	1
2	95 °C	30 segundos	35x
	60 °C	45 segundos (lectura de placa)	

7.6.4. Utilice los datos del análisis qPCR para comprobar la contaminación; para ello, calcule los valores de ΔCt entre los controles (positivo y negativo) y el CB mediante la ecuación siguiente:

$$\Delta Ct = Ct (CB) - Ct (control)$$

Si ΔCt es ≥ 4,0 para ambos controles, continúe con el paso siguiente. Si ΔCt es < 4,0 para cualquiera de los controles, consulte el apartado 14 Guía de resolución de problemas para obtener más instrucciones.

Si está multiplicando varias dianas, consulte el Anexo A (apartado 20) para obtener más información sobre el valor de ΔCt cualificado para otros productos de PCR en LymphoTrack Dx Assay – MiSeq.

- 7.6.5. Utilice los datos del análisis qPCR para determinar la concentración de amplicones de cada muestra mediante la ecuación siguiente:

$$\text{Concentración del amplicón sin diluir (nM)} = \frac{452 \times \text{conc. prom. (pM) calculada por qPCR}}{A} \times 4$$

452 representa la longitud media de fragmento (pb) del DNA Standard (Patrón de ADN) de KAPA Illumina.

A = longitud media de fragmento de los amplicones generados con el ensayo *IGHV Leader* = 660 pb (A = 660).

La longitud de la secuencia incluye nucleótidos adicionales necesarios para la secuenciación.

Nota: Si está multiplicando varias dianas, consulte el Anexo A (apartado 20) para conocer la longitud media de fragmento de los amplicones generados en otro LymphoTrack Dx Assay – MiSeq.

7.7. Combinación y cuantificación de la genoteca

La cantidad de ADN de la genoteca cargada en la celda de flujo de MiSeq es esencial para generar una densidad de conglomerados óptima y obtener datos de alta calidad en una carrera de secuenciación. **Se recomienda encarecidamente la cuantificación de la genoteca por qPCR.**

- 7.7.1. De acuerdo con la concentración de amplicones calculada a partir de los resultados de qPCR, añada la misma cantidad de amplicones (a excepción del CB, que se puede excluir).
- P. ej., diluya cada amplicón a 4 nM en un volumen total de 10 µL usando solución tampón A como diluyente.
 - Combine 10 µL de cada amplicón a 4 nM.
 - Para las muestras con una concentración < 4 nM, añada la cantidad máxima posible de muestra (10 µL) y no añada solución tampón A a esa muestra.
- 7.7.2. Mezcle suavemente en el agitador vortex y centrifugue brevemente.

7.8. Dilución de la genoteca combinada

1:1000 Final:

Paso A: 2 µL de genoteca combinada + 198 µL de solución tampón A.

Pipetee arriba y abajo 10 veces para mezclar bien.

Paso B: 20 µL del paso A + 180 µL de solución tampón A.

Pipetee arriba y abajo 10 veces para mezclar bien.

7.9. Configuración de qPCR para la cuantificación de genotecas

Consulte la configuración de qPCR en la Tabla 6 y el programa del termociclador en la Tabla 7.

- 7.9.1. Determine la concentración de la genoteca combinada a partir de los resultados de qPCR.

$$\text{Concentración del amplicón sin diluir (nM)} = \frac{452 \times \text{conc. prom. (pM) calculada por qPCR}}{A}$$

452 representa la longitud media de fragmento (pb) del DNA Standard (Patrón de ADN) de KAPA Illumina.

A = longitud media de fragmento de los amplicones generados con el ensayo *IGHV Leader* = 660 pb (A = 660).

La longitud de la secuencia incluye nucleótidos adicionales necesarios para la secuenciación.

Nota: Si está multiplicando varias dianas, consulte el Anexo A (apartado 20) para conocer la longitud media de fragmento de los amplicones generados en otro LymphoTrack Dx Assay – MiSeq.

7.10. Preparación de la genoteca para la carrera de secuenciación de MiSeq

Al final de este apartado, la concentración de ADN de la genoteca será de **12 - 20 pM para el kit de reactivos MiSeq v3**. Para multiplicar amplicones de diferentes ensayos LymphoTrack Dx para MiSeq en una sola genoteca, consulte el *Anexo A: Creación de una genoteca de secuenciación con varias dianas SNG* (apartado 20).

- 7.10.1. Determine la cantidad de genoteca que va a preparar en función de la concentración de la genoteca combinada obtenida a partir de los resultados de qPCR y diluya si es necesario:
- Si la genoteca es de más de 4 nM, diluya la genoteca a 4 nM en un volumen final de 10 µL usando la solución tampón A.
 - Si la genoteca es de menos de 4 nM, use 10 µL de la genoteca directamente para el paso siguiente.

7.10.2. Siga estas instrucciones para desnaturalizar el ADN de la genoteca.

- Prepare una solución de NaOH, 0,2 N. Para posibilitar la desnaturalización total del ADN de la muestra y generar una densidad de conglomerados óptima en MiSeq, es fundamental usar una solución recién preparada.
- Agregue 10 µL de NaOH, 0,2 N a la genoteca diluida (10 µL) preparada en el paso anterior.

Tabla 8. Desnaturalización de la genoteca

Reactivo	Volumen
Genoteca diluida	10 µL
NaOH, 0,2 N	10 µL
Volumen total	20 µL

7.10.1. Agite brevemente con el agitador vortex para mezclar la solución y, a continuación, centrifugue brevemente para asegurarse de que toda la solución se haya asentado en el fondo del tubo. Incube durante 5 minutos a temperatura ambiente para desnaturalizar la genoteca de ADNbc en ADN monocatenario (ADNmc).

7.10.2. Agregue 980 µL de buffer HT1 previamente enfriado (se incluye en los kits de reactivos de MiSeq) al tubo que contiene el ADN de la genoteca desnaturalizada:

Tabla 9. Adición de buffer HT1

Reactivo	Volumen
Genoteca desnaturalizada	20 µL
Buffer HT1	980 µL
Volumen total	1000 µL

7.10.3. Agite con el agitador vortex brevemente para mezclar y, a continuación, centrifugue por pulsos la solución de ADN de la genoteca diluida y desnaturalizada.

7.10.4. Coloque la genoteca diluida y desnaturalizada en hielo hasta el paso siguiente.

Si está multiplicando varias dianas, consulte el Anexo A (apartado 20) para conocer la concentración de carga y el kit de reactivos de MiSeq.

Para el Control Software (Software de control) de MiSeq (MCS v2.6 o posterior):

La concentración de ADN de la genoteca debe ser de 12 - 20 pM para el kit de reactivos MiSeq v3.

7.10.5. Saque la genoteca de ADNmc diluida del hielo y siga estas instrucciones para diluirla aún más como preparación para su carga en MiSeq:

- Si la concentración de la genoteca de ADNmc es de 40 pM (la concentración inicial era de 4 nM), diluya hasta la concentración de carga en MiSeq deseada de acuerdo con los ejemplos siguientes:

Tabla 10. Preparación de la genoteca para la carga en MiSeq

Concentraciones finales	12 pM	20 pM
Genoteca desnaturalizada	300 µL	500 µL
Buffer HT1	700 µL	500 µL
Concentración final de NaOH (mM)	0,6 mM	1,0 mM

- Si la concentración de la genoteca de ADNmc diluida es inferior a 40 pM (la concentración inicial era inferior a 4 nM), diluya el ADN desnaturalizado adecuadamente hasta la concentración de carga en MiSeq deseada (*p.ej.*, 12 pM).
- Asegúrese de que la concentración final de NaOH no sea superior a 1,0 mM.

7.10.6. Invierta la genoteca final 5 veces para mezclarla y centrifugue por pulsos.

7.10.7. Coloque la genoteca final en hielo hasta el momento de cargarla en el Reagent Cartridge (Cartucho de reactivos) de MiSeq.

7.11. Carga de la Flow Cell (Celda de flujo) de MiSeq

Cargue 600 µL de la genoteca final en un Reagent Cartridge (Cartucho de reactivos) de MiSeq.

7.12. Configuración de la Sample Sheet (Hoja de muestras) de MiSeq

Consulte la documentación más reciente de Illumina para la creación de hojas de muestras. Cargue la hoja de muestras en el instrumento MiSeq. Si utiliza un software asociado a Illumina (por ejemplo, Local Run Manager [LRM]), seleccione *TruSeq Nano DNA (TruSeq ADN Nano)* para el Library Prep Kit (kit de preparación de genotecas) y *TruSeq DNA Single Indexes Set A B (TruSeq ADN Conjunto de índices individuales A B)* para el Index Kit (kit de índices).

Caracteres en el nombre de la muestra:

- Cree un nombre e identificador únicos al nombrar cada muestra. Si analiza muestras duplicadas, use nombres similares (p. ej., Muestra1a y Muestra1b).
- Si no utiliza nombres exclusivos para las muestras secuenciadas en una misma celda de flujo, LymphoTrack Dx Software – MiSeq solo analizará una de las muestras en el proceso de análisis.
- Utilice únicamente caracteres alfanuméricos y guiones (A-Z, a-z, 0-9, ., -,) al configurar la Sample Sheet (Hoja de muestras).

Nombre de la muestra al multiplicar:

Los índices solo pueden aparecer una vez en la Sample Sheet (Hoja de muestras). Por lo tanto, el campo Sample ID (ID de la muestra) —que figurará en el nombre de archivo FASTQ— debe abarcar todos aquellos datos necesarios para hacer un seguimiento de las muestras secuenciadas con dianas múltiples y un mismo índice.

Haga un seguimiento de todas las muestras y dianas de la misma serie de MiSeq que se hayan secuenciado utilizando el mismo índice. A este conjunto de muestras/dianas se le debe asignar un identificador único en el campo Sample ID (ID de la muestra) de la Sample Sheet (Hoja de muestras). Al elegir el nombre, tenga en cuenta que el Sample ID (ID de la muestra) tiene un límite estricto de **40 caracteres**.



Cuando se introduce información en el campo *Sample Name (Nombre de la muestra)* de la *Sample Sheet (Hoja de muestras)*, la información se incorpora de manera predeterminada al nombre del archivo FASTQ en lugar del *Sample ID (ID de la muestra)*. Deje este campo en blanco o copie los datos que introdujo en el campo *Sample ID (ID de la muestra)*. Si introduce otra información en el campo *Sample Name (Nombre de la muestra)*, asegúrese de incluir un identificador único y cumplir las recomendaciones anteriores para poder hacer un seguimiento de las muestras.

¡Importante!

LymphoTrack Dx Software – MiSeq no reconoce las secuencias del adaptador.

- Si utiliza un software asociado a Illumina, como Local Run Manager (LRM), **debe seleccionar el ajuste del adaptador al crear la hoja de muestras.**

Tabla 11. Índices de las mezclas maestras de LymphoTrack Dx Assays

Índice de mezcla maestra de PCR de LymphoTrack Dx Assay – MiSeq	Secuencia de índice	TruSeq DNA Single Indexes Set A B (TruSeq ADN Conjunto de índices individuales A B) (LRM “Index Kit” [kit de índices])
id01	ATCACG	AR001
id02	CGATGT	AR002
id03	TTAGGC	AR003
id04	TGACCA	AR004
id05	ACAGTG	AR005
id06	GCCAAT	AR006
id07	CAGATC	AR007
id08	ACTTGA	AR008
id09	GATCAG	AR009
id10	TAGCTT	AR010
id11	GGCTAC	AR011
id12	CTTGTA	AR012
id13	AGTCAA	AR013
id14	AGTTCC	AR014
id15	ATGTCA	AR015
id16	CCGTCC	AR016
id18	GTCCGC	AR018
id19	GTGAAA	AR019

Tabla 11. Índices de las mezclas maestras de LymphoTrack Dx Assays

Índice de mezcla maestra de PCR de LymphoTrack Dx Assay – MiSeq	Secuencia de índice	TruSeq DNA Single Indexes Set A B (TruSeq ADN Conjunto de índices individuales A B) (LRM “Index Kit” [kit de índices])
id20	GTGGCC	AR020
id21	GTTTCG	AR021
id22	CGTACG	AR022
id23	GAGTGG	AR023
id25	ACTGAT	AR025
id27	ATTCTT	AR027

7.13. Inicio de la serie de MiSeq

Inicie la serie de MiSeq siguiendo las instrucciones del Control Software (Software de control) de MiSeq. La Tabla 12 recoge los tiempos aproximados de las series de MiSeq.

Tabla 12. Tiempos de las series de MiSeq

Kit de reactivos de MiSeq	Longitud de lectura	Versión de MCS	Tiempo total de la serie de MiSeq
v3	2x301 pb	v2.6 o posterior	~ 56 horas

Nota: Si se usa un kit con menos ciclos, no será suficiente para generar las longitudes de lectura necesarias para este ensayo.

8. Análisis de datos

LymphoTrack Dx *IGHV* Leader Somatic Hypermutation Assay – MiSeq se diseñó para producir datos de secuenciación que pudieran analizarse con el paquete LymphoTrack Dx Software – MiSeq, el cual se proporciona en el CD (REF 95000009) incluido con el pedido. Dicho CD incluye instrucciones detalladas de instalación y uso del software.

9. Especificaciones del ensayo

Los valores que genera el software se redondean a la cifra decimal más cercana para determinar el resultado del ensayo.

- % de lecturas más comunes con control positivo en *IGH* $\geq 2,5$ %
- % de lecturas más comunes con control negativo en *SNG* $< 1,0$ %
- % de lecturas con control positivo para HS en *IGH* $\geq 2,5$ %
- Tasa de mutación con control positivo para HS en *IGH* $\geq 2,0$ %
- % Q30 de validez de la serie de MiSeq > 70 % para v3 (2x301)

***Nota:** El Q30 de todas las validaciones analíticas cumple los criterios de la especificación Q30 de Illumina MiSeq indicados arriba. No obstante, la puntuación Q30 puede variar en función de la calidad de la muestra. Si el Q30 está por debajo de la especificación Q30 de Illumina, compruebe el valor Q30 del índice en el informe de LymphoTrack Dx después de analizar los datos con LymphoTrack Dx Software – MiSeq.

Si la puntuación Q30 de un índice en el informe de LymphoTrack Dx no satisface la especificación de Illumina, considere el índice como no válido.

10. Limitaciones del procedimiento

- Este ensayo no identifica el 100 % de las poblaciones de células clonales.
- La mayor parte de las tecnologías, incluso la de secuenciación masiva, presentan un mayor nivel de varianza cuando se alcanza el límite de detección (LD) del propio método. Se sugiere realizar pruebas de seguimiento si un resultado se acerca al LD analítico del ensayo.
- Los ensayos basados en la PCR están sujetos a interferencia por degradación del ADN o inhibición de la amplificación de PCR en caso de presencia de heparina u otros fármacos en la muestra analizada.
- Los resultados de las pruebas de clonalidad molecular siempre deben interpretarse en el contexto de los datos clínicos, histológicos e inmunofenotípicos disponibles.

11. Interpretación y elaboración de informes

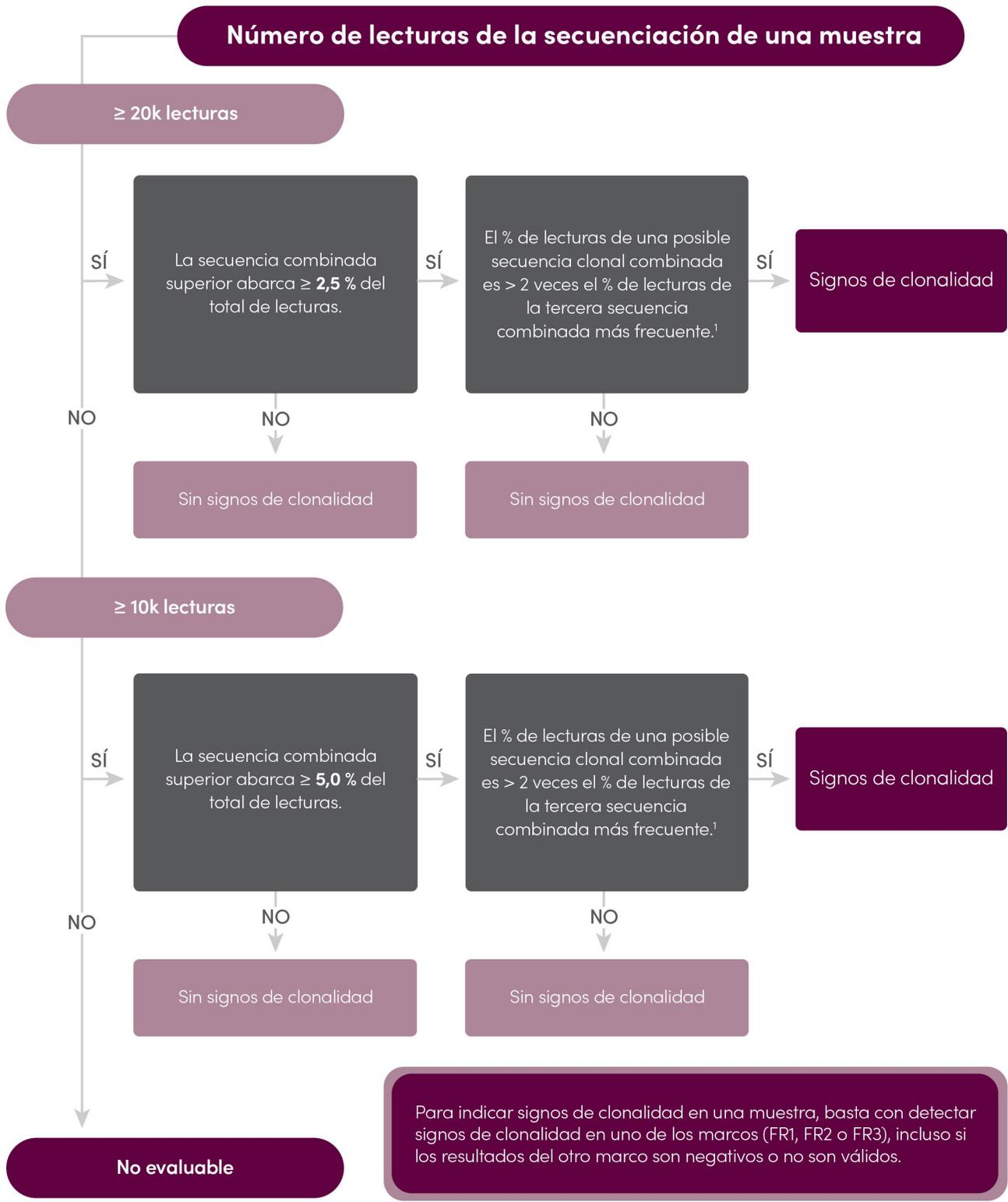
El informe *Merged Read Summary (Resumen de lecturas combinadas)* permite identificar las secuencias de lecturas combinadas más comunes y su frecuencia antes de determinar la clonalidad mediante los criterios que se recogen a continuación. Consulte el apartado 8 *Análisis de datos* para obtener más información sobre el informe *Merged Read Summary (Resumen de lecturas combinadas)*. Ciertos procesos clonales pueden dar lugar a la detección de dos o más clones. Ejemplos de esto serían una población dominante con una pequeña población subclonal o si hay presentes varias neoplasias linfoproliferativas. Es fundamental que estos casos se interpreten en un contexto clínico.

* Tenga cuidado al interpretar resultados “none” (ninguno) para el gen V, D o J en lecturas con posible clonalidad. Se asigna “none” (ninguno) si la alineación no satisface el umbral de calidad mínimo debido a una alineación deficiente.

Tabla 13. Criterios de interpretación de clonalidad

Criterio 1	Criterio 2	Criterio 3	Resultado
El número total de lecturas de cada muestra es ≥ 20 000 .	La secuencia combinada más común abarca ≥ 2,5 % del total de lecturas.	El % de lecturas de una posible secuencia clonal combinada es > 2 veces el % de lecturas de la 3.ª secuencia combinada más frecuente. ¹	DETECCIÓN DE SIGNOS DE CLONALIDAD
		El % de lecturas de una posible secuencia clonal combinada es ≤ 2 veces el % de lecturas de la 3.ª secuencia combinada más frecuente. ¹	Sin detección de signos de clonalidad
El número total de lecturas de cada muestra es ≥ 10 000 y < 20 000 .	La secuencia combinada más común abarca ≥ 5,0 % del total de lecturas.	El % de lecturas de una posible secuencia clonal combinada es > 2 veces el % de lecturas de la 3.ª secuencia combinada más frecuente. ¹	DETECCIÓN DE SIGNOS DE CLONALIDAD
		El % de lecturas de una posible secuencia clonal combinada es ≤ 2 veces el % de lecturas de la 3.ª secuencia combinada más frecuente. ¹	Sin detección de signos de clonalidad
El número total de lecturas de cada muestra es < 10 000 .	N. P.	N. P.	No evaluable

¹Los cálculos del software se redondean a la cifra decimal más cercana para su comparación.



¹Los valores que genera el software se redondean a la cifra decimal más cercana para su comparación.

Figura 2: Interpretación de la clonalidad de los datos según los criterios de la Tabla 13.

Después de determinar la clonalidad, puede evaluarse la hipermutación somática (HS) de las muestras. Los criterios para interpretar la HS recogidos a continuación deben usarse en caso de haber realizado el análisis de la secuencia del gen de la inmunoglobulina para el pronóstico de la LLC de acuerdo con la bibliografía actual (Langerak *et al.*, 2011).

A fines de interpretación de la HS, deben evaluarse las dos secuencias combinadas más relevantes y comprobar la existencia de clonalidad a partir de los criterios que figuran en el apartado anterior. Cada secuencia combinada con evidencias de clonalidad puede evaluarse entonces a través de los criterios de HS que figuran a continuación (consulte la Figura 3 para conocer el diagrama de flujo correspondiente).

Tabla 14. Criterios sugeridos para la interpretación de la HS

Criterio 1	Criterio 2	Criterio 4	Resultado
Una de las secuencias combinadas es indicativa de clonalidad.	Si tanto el valor Ajuste in-frame como el valor Sin codón de parada son "S"	Tasa de mutación para el gen V parcial $\geq 2,0\%$	PRESENCIA DE HS (productivo o mutado)
		Tasa de mutación para el gen V parcial $< 2,0\%$	Sin presencia de HS (productivo o sin mutar)
	Si alguno (o ambos) de los valores Ajuste in-frame o Sin codón de parada son "N"	Tasa de mutación para el gen V parcial $\geq 2,0\%$	No concluyente (improductivo o mutado)
		Tasa de mutación para el gen V parcial $< 2,0\%$	No concluyente (improductivo o sin mutar)
Ninguna de las secuencias combinadas es indicativa de clonalidad.	N. P.	N. P.	No concluyente (sin secuencia clonal)

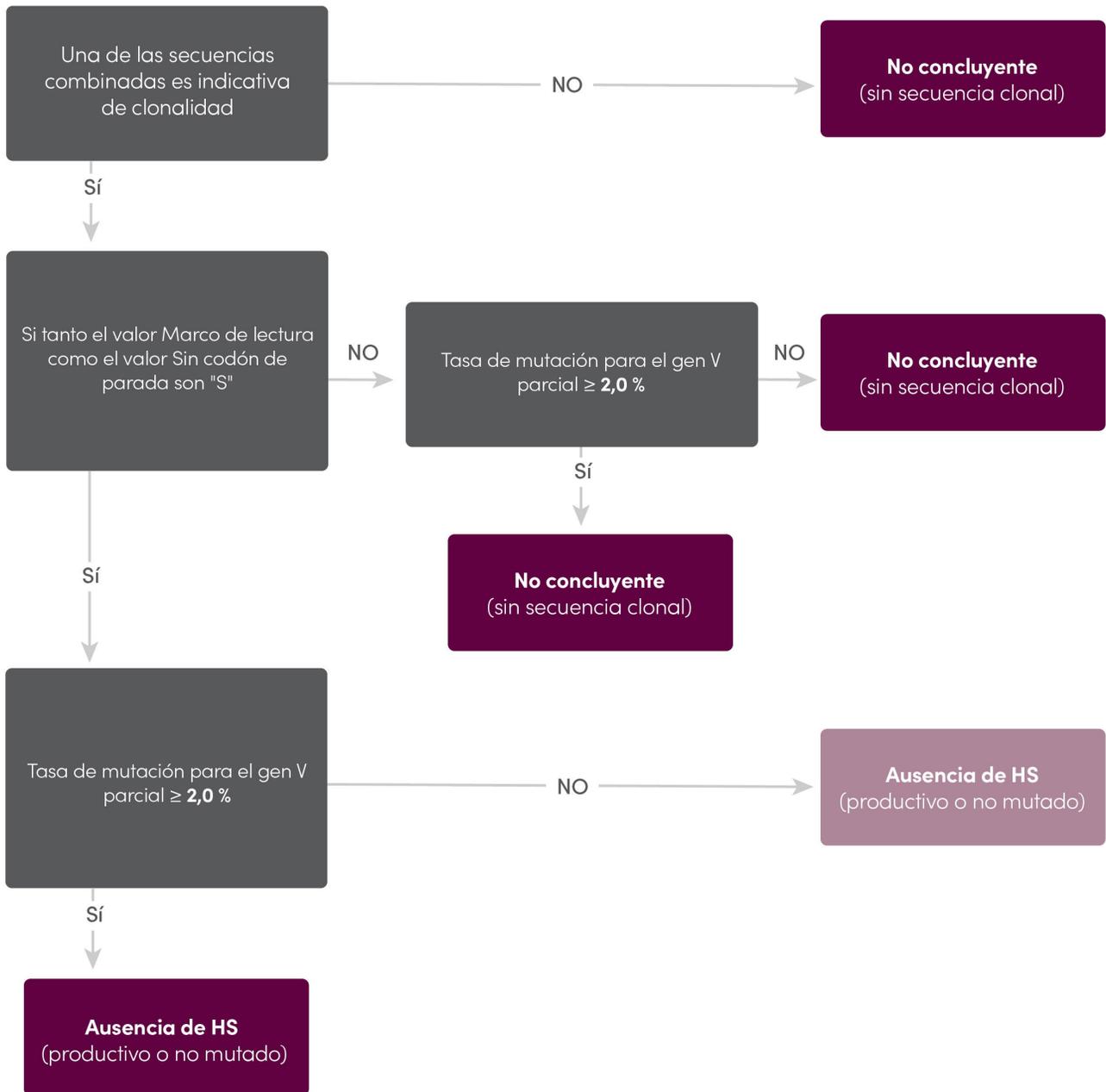
Si el resultado de HS es "no concluyente" debido a que no hay secuencias combinadas que muestren evidencia de clonalidad, el estado de HS puede evaluarse aún más analizando la muestra con LymphoTrack Dx IGH FR1 Assay – MiSeq.

Nota: Si dos de las secuencias combinadas de una misma muestra son indicativas de clonalidad, cada una de ellas debe volver a evaluarse de acuerdo con la tabla siguiente para determinar el resultado final de HS para esa muestra.

Tabla 15. Criterios sugeridos para la interpretación de la HS de reordenamiento doble

Criterio 1	Secuencia clonal A	Secuencia clonal B	Resultado
Reordenamientos dobles	PRESENCIA DE HS (productivo o mutado)	PRESENCIA DE HS (productivo o mutado)	PRESENCIA DE HS
	PRESENCIA DE HS (productivo o mutado)	Sin presencia de HS (productivo o sin mutar)	No concluyente
	PRESENCIA DE HS (productivo o mutado)	No concluyente (improductivo o mutado)	PRESENCIA DE HS
	PRESENCIA DE HS (productivo o mutado)	No concluyente (improductivo o sin mutar)	PRESENCIA DE HS
	Sin presencia de HS (productivo o sin mutar)	Sin presencia de HS (productivo o sin mutar)	Sin presencia de HS
	Sin presencia de HS (productivo o sin mutar)	No concluyente (improductivo o mutado)	No concluyente
	Sin presencia de HS (productivo o sin mutar)	No concluyente (improductivo o sin mutar)	Sin presencia de HS
	Alguna no concluyente	Alguna no concluyente	No concluyente

Criterios sugeridos para la interpretación de la HS



Nota: Si dos de las secuencias combinadas de una misma muestra son indicativas de clonalidad, evalúe cada una de ellas de acuerdo con la Tabla 15 para determinar el resultado final de HS para esa muestra.

Figura 3: Criterios sugeridos para la interpretación de la hipermutación somática (HS) de acuerdo con la Tabla 14.

12. Datos de muestra

LymphoTrack Dx Report for assay LEADER

Sample name: Leader_SHM_positive_S23_L001_001_combined

Total Read Count: 474947

IndexQ30: 87.88

Caution: Do not edit fields and save.

Top 10 Merged Read Summary

Rank	Sequence	Length	Merge count	V-gene	J-gene	% total reads	Cumulative %	Mutation rate to partial V-gene (%)	In-frame (Y/N)	No Stop codon (Y/N)	V-coverage	CDR3 Seq
1	TTCTCGTGGTGGC	455	50248	IGHV4-59_08	IGHJ4_02	10.58	10.58	11.26	Y	Y	98.63	GCGAGACGGAGC
2	CTGCTACTGACTG	319	192	IGHV2-70_10	IGHJ4_02	0.04	10.62	4.32	n/a	N	35.55	not found
3	CTGCTGCTGACCA	466	175	IGHV2-5_01	IGHJ5_01	0.04	10.66	6.62	Y	Y	100.00	GCACACAGACCGC
4	CTGCTGCTGACCA	457	162	IGHV2-5_05	IGHJ6_02	0.03	10.69	2.99	Y	Y	99.67	GCACACAGATACT
5	CTGCTGCTGACCA	474	154	IGHV2-5_05	IGHJ4_02	0.03	10.72	3.99	Y	Y	99.67	GCACACAGATACT
6	CTGCTGCTGACCA	454	150	IGHV2-5_10	IGHJ5_02	0.03	10.76	11.78	Y	Y	98.99	GCATATGGTGTA
7	CTGCTGCTGACCA	469	139	IGHV2-5_01	IGHJ4_02	0.03	10.78	1.32	Y	Y	97.68	GCACCTCGGACAC
8	CTCGCCCTCCTCC	466	139	IGHV5-51_01	IGHJ4_02	0.03	10.81	7.09	Y	Y	99.32	GCGAGATACTATT
9	CTGCTACTGACTG	490	137	IGHV2-70_10	IGHJ3_02	0.03	10.84	0.66	Y	Y	99.34	GCACGGATTCTCTG
10	CTGCTGCTGACCA	478	135	IGHV2-5_10	IGHJ6_02	0.03	10.87	3.70	Y	Y	98.99	GCATACACTTGT

Figura 4: Esta tabla, generada por medio de LymphoTrack Dx Software – MiSeq, presenta las 10 lecturas más comunes del resumen de lecturas combinadas con las 500 lecturas más comunes. Las lecturas se combinan entre sí cuando se diferencian en 1 o 2 nucleótidos (nt). Las secuencias se generaron con LymphoTrack Dx IGHV Leader Somatic Hypermutation Assay – MiSeq y se analizaron con LymphoTrack Dx Software – MiSeq (REF: 95000009).

Tenga en cuenta lo siguiente: si LymphoTrack Dx Software – MiSeq no puede asignar el gen V o el gen J, el resultado de ajuste in-frame será N/A (N. P.). Si el software no puede determinar el ajuste in-frame, no podrá realizar una evaluación precisa de la ausencia de codón de parada. Se comprobarán todos los marcos de lectura abiertos para ver si hay un codón de parada y muy probablemente se encontrará uno (Sin codón de parada = N). Asegúrese de utilizar otros recursos para determinar la productividad si el gen V o el gen J están etiquetados como "none" (ninguno).

13. Características de rendimiento

El estado de la hipermutación somática de las muestras clínicas se evaluó mediante LymphoTrack Dx *IGHV* Leader Somatic Hypermutation Assay – MiSeq y la secuenciación Sanger de amplicones de PCR de *IGH* FR1. Tras comparar los resultados, la coincidencia (o porcentaje total de coincidencia), el porcentaje de coincidencias positivas (PPA) y el porcentaje de coincidencias negativas (NPA) fueron del 98 % (44/45 casos), el 100 % y el 94 % respectivamente.

Tabla 16. Comparación entre LymphoTrack Dx *IGHV* Leader Somatic Hypermutation Assay – MiSeq y la secuenciación de Sanger para el estado de la hipermutación somática

		Secuenciación de Sanger	
		Presencia de HS	Sin presencia de HS
LymphoTrack Dx <i>IGHV</i> Leader Assay – MiSeq	Presencia de HS	28	1
	Sin presencia de HS	0	16

El rendimiento analítico de LymphoTrack Dx *IGHV* Leader Somatic Hypermutation Assay – MiSeq se evaluó mediante el análisis de ADN de una línea celular clonal en ADN de amígdala con distintas diluciones. El límite de detección (LD) se observó en una dilución de ADN al 5 %. El mayor porcentaje de lecturas de ADN de amígdala fue < 1 %. La regresión lineal R^2 fue > 0,99 para un intervalo entre el 0 % y el 10 % de dilución de ADN. El coeficiente de variación (CV%) en 8 series de 2 operadores, 2 lotes de reactivos y 2 instrumentos fue inferior al 20 % cuando se analizaron diluciones del 5 % y el 10 % de ADN.

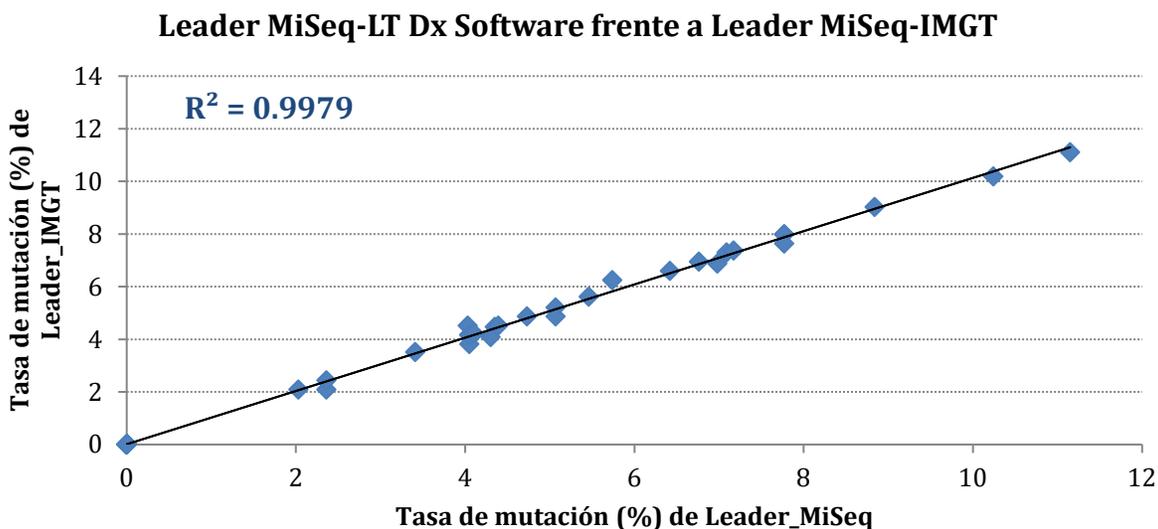


Figura 5: Comparación de la tasa de hipermutación somática (HS) para 45 muestras de LLC determinadas mediante LymphoTrack Dx *IGHV* Leader Somatic Hypermutation Assay – MiSeq y analizadas con LymphoTrack Dx Software – MiSeq o el análisis ImMunoGeneTics® (IMGT).

14. Guía de resolución de problemas

Tabla 17. Guía de resolución de problemas

Se produce durante	Error	Acción
Preparación de muestras y reactivos	La cantidad de ADN de la muestra es inferior a 50 ng en un método con ADNbc	No analice la muestra
Preparación de muestras y reactivos	La integridad del ADN de la muestra es baja	Analice la muestra con Specimen Control Size Ladder (Escalera de tamaño de control de muestras), disponible en Invivoscribe (REF 20960021 para la detección por ABI o REF 20960020 para la detección por gel)
Cuantificación de amplicones mediante el kit de cuantificación de genotecas KAPA	$\Delta Ct < 4,0$ $\Delta Ct = Ct (CB) - Ct (control)$	Compruebe la curva estándar en qPCR. Compruebe si existe contaminación y repita la qPCR KAPA para todas las muestras y controles. Si ΔCt vuelve a ser $< 4,0$, vuelva a realizar la PCR y la qPCR de todas las muestras y controles
Creación de la genoteca mediante cuantificación y agrupamiento de amplicones	La concentración de amplicones es menor que 1 nM	Compruebe la curva estándar en la qPCR y repita la PCR si es inferior a 1 nM
Configuración de la serie de MiSeq	No se encuentra la hoja de muestras	Consulte la resolución de problemas de Illumina o llame al soporte técnico de Illumina al +1-800-809-4566
	Hoja de muestras con formato incorrecto	
	Error de comprobación de fluidos	
	Poco espacio en el disco	
	Frasco de residuos vacío	
	Red desconectada	
Serie de MiSeq	*% Q30 < 70 % para v3 (2x301)	Llame al soporte técnico de Invivoscribe al +1-858-224-6600
Instalación del CD	El software LymphoTrack Dx no se instala correctamente	Llame al soporte técnico de Invivoscribe al +1-858-224-6600
Análisis de datos	El software LymphoTrack Dx deja de funcionar	Llame al soporte técnico de Invivoscribe al +1-858-224-6600
Análisis de datos	No se detecta ninguna secuencia clonal para el control positivo	Llame al soporte técnico de Invivoscribe al +1-858-224-6600
Control blanco (CB)	El CB muestra amplificación tras la PCR	Repita el ensayo

* El Q30 de todas las validaciones analíticas cumple los criterios de la especificación Q30 de Illumina MiSeq indicados previamente. No obstante, la puntuación Q30 puede variar en función de la calidad de la muestra. Si el Q30 está por debajo de la especificación Q30 de Illumina, compruebe el valor Q30 del índice en el informe de LymphoTrack Dx después de analizar los datos con LymphoTrack Dx Software – MiSeq. Si la puntuación Q30 de un índice en el informe de LymphoTrack Dx no satisface la especificación de Illumina, considere el índice como no válido.

15. Servicio técnico y atención al cliente

Gracias por comprar nuestro LymphoTrack Dx *IGHV* Leader Somatic Hypermutation Assay – MiSeq. Damos a su negocio el valor que realmente tiene. Será un placer ayudarle a comprender cómo funciona el kit de ensayo. Proporcionamos asistencia técnica continuada de lunes a viernes, de modo que pueda seguir usando eficazmente los kits de ensayo en su laboratorio.

Datos de Contacto



Invivoscribe, Inc

10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego | California 92121-2711 | Estados Unidos

Teléfono: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Horario comercial: De 07:00 a 17:00 PST/PDT

Servicio técnico: support@invivoscribe.com | Atención al cliente: sales@invivoscribe.com | Sitio web: www.invivoscribe.com

16. Referencias

1. Tonegawa, S. (1983). Somatic Generation of Antibody Diversity. *Nature* 302, 575–581.
2. Ghia, P. *et al.*, (2007). ERIC recommendations on *IGHV* gene mutational status in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 21, 1–3.
3. Trainor, KJ. *et al.*, (1990). Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level. *Blood* 75, 2220–2222.
4. Miller, JE. (2013). Principle of Immunoglobulin and T Cell Receptor Gene Rearrangement. En: Cheng, L.; Zhang, D.; Eble, J. N. (Eds), *Molecular Genetic Pathology* (2nd Ed., sections 30.2.7.13 and 30.2.7.18). New York, USA: Springer Science & Business Media.
5. Davi, F. *et al.*, (2008). Determination of *IGHV* gene mutational status in chronic lymphocytic leukemia: bioinformatics advances meet clinical needs. *Leukemia* 22, 212-214.
6. Ghia, P. *et al.*, (2005): Geographic patterns and pathogenetic implications of *IGHV* gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the *IGHV3-21* gene. *Blood* 105, 1678-1685.
7. Langerak, AW. *et al.*, (2011) Immunoglobulin sequence analysis and prognostication in CLL: guidelines from the ERIC review board for reliable interpretation of problematic cases. *Leukemia* 25, 979–984.
 - Instrucciones de uso del paquete LymphoTrack Dx Software – MiSeq (REF 95000009)
 - <https://www.beckmancoulter.com>
 - <http://www.illumina.com>
 - <http://www.invitrogen.com>
 - <http://www.kapabiosystems.com>
 - <http://www.thermofisher.com>

17. Símbolos

Los siguientes símbolos se usan en el etiquetado de los productos de diagnósticos por SNG de Invivoscribe:

	Número de Catálogo		Fecha de Caducidad
	Volumen de Reactivo		Representante Autorizado en la Comunidad Europea
	Número de Lote		Consulte las instrucciones de uso
	Condiciones de Conservación		Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	Identificador Único de Dispositivo		Fabricante
	Conformidad del Reino Unido Evaluada		Persona Responsable del Reino Unido
	Representante Autorizado en Suiza		Conformidad Europea
	Aplicación de software		

18. Aviso legal

Este producto está cubierto por una o más de las siguientes patentes o solicitudes de patente, que son propiedad o cuentan con licencia exclusiva de Invivoscribe, Inc. (IVS): patente estadounidense n.º 7,785,783; patente estadounidense n.º 8,859,748 (junto con las solicitudes de división relacionadas con la solicitud original); patente europea n.º EP1549764B1 (validada en 16 países y ampliada por las patentes europeas relacionadas n.º EP2418287A3 y EP2460889A3); patente japonesa n.º JP04708029B2; solicitud de patente japonesa n.º 2006-529437; solicitud de patente brasileña n.º PI0410283.5; patente canadiense n.º CA2525122; patente india n.º IN243620; patente mexicana n.º MX286493; patente china n.º CN1806051; y patente coreana n.º 101215194.

El uso de este producto puede requerir métodos de amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La adquisición de las licencias necesarias para llevar a cabo métodos de amplificación o para usar reactivos, enzimas de amplificación o equipos cubiertos por patentes de terceros es responsabilidad del usuario. Invivoscribe, Inc. no otorga dicha licencia de forma explícita ni implícita.

©2024 Invivoscribe, Inc. Todos los derechos reservados. Las marcas comerciales que figuran en este documento son propiedad de Invivoscribe, Inc. o de sus filiales y, en el caso de marcas comerciales de terceros, de sus respectivos propietarios.

ILLUMINA® y MISEQ™ son marcas registradas de Illumina, Inc.

BECKMAN COULTER®, AGENCOURT®, AMPURE® y SPRIPLATE® son marcas registradas de Beckman Coulter, Inc.

ROCHE® es una marca registrada y EAGLETAQ™ es una marca comercial de Roche.

VERITI®, SYBR®, AMBION®, APPLIED BIOSYSTEMS® y LIFE TECHNOLOGIES® son marcas registradas de Thermo Fisher Scientific y sus filiales.

KAPA™ es una marca comercial de Kapa Biosystems.

MICROSOFT®, WINDOWS® y EXCEL® son marcas registradas de Microsoft Corporation.

19. LymphoTrack Dx *IGHV* Leader Somatic Hypermutation Assay – MiSeq: guía sintética

- 19.1. Use guantes para sacar las mezclas maestras del congelador. Deje que los tubos se descongelen y, a continuación, mezcle suavemente con el agitador vortex.
- 19.2. En una campana de contención o cabina sin circulación de aire, pipetee 45 μL de la mezcla maestra en pocillos individuales de una placa para PCR. Un pocillo para cada mezcla maestra y una mezcla maestra por muestra y controles positivo, negativo o blanco.
- 19.3. Añada 0,2 μL de ADN Taq polimerasa (5 U/ μL) a cada mezcla maestra.
- 19.4. Añada 5 μL de ADN de la muestra con una concentración mínima de 10 ng/ μL y 5 μL de las muestras de control a los pocillos con las reacciones de mezcla maestra respectivas y pipetee arriba y abajo 5-10 veces para mezclar.
- 19.5. Añada 5 μL de agua para uso en biología molecular al pocillo con la mezcla maestra para el control blanco y pipetee arriba y abajo 5-10 veces para mezclar.
- 19.6. Amplifique el ADN diana mediante el siguiente programa del termociclador:

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclo
1	95 °C	7 minutos	1
2	95 °C	45 segundos	32x
3	60 °C	45 segundos	
4	72 °C	90 segundos	
5	72 °C	10 minutos	1
6	15 °C	∞	1

- 19.7. Extraiga la placa de amplificación del termociclador.
- 19.8. Purifique los productos derivados de la PCR por medio del sistema PCR Purification (Purificación por PCR) Agencourt AMPure XP. Añada 50 μL de partículas a cada reacción de 50 μL ; eluya el ADN en 25 μL de eluido.
- 19.9. Cuantifique los amplicones con el kit de cuantificación de genotecas KAPA de acuerdo con las instrucciones del kit. Diluya los amplicones a 1:4000 antes de continuar con la qPCR.
- 19.10. Agrupe cantidades iguales de amplicones de muestras (sin incluir el control blanco), diluya a 1:1000 y cuantifique la genoteca con el kit de cuantificación de genotecas KAPA.
- 19.11. Desnaturalice y diluya la genoteca a 12 - 20 pM para el kit de reactivos MiSeq v3 (MCS v2.6 o posterior).
- 19.12. Cargue 600 μL de la genoteca desnaturalizada y diluida en el Reagent Cartridge (Cartucho de reactivos) de MiSeq.
- 19.13. Configure una hoja de muestras de MiSeq y cargue la hoja de muestras en el instrumento (si es necesario).
- 19.14. Inicie la serie de MiSeq.
- 19.15. Analice y visualice los datos adquiridos por medio del paquete LymphoTrack Dx Software – MiSeq.

20. Anexo A: Creación de una genoteca de secuenciación con varias dianas SNG

Si se analizan en paralelo varias dianas con un LymphoTrack Dx Assay – MiSeq diferente, es importante tener en cuenta las diferencias de procedimiento entre cada ensayo. Por ejemplo, el ensayo *IGHV* Leader utiliza 32 ciclos de PCR y debe colocarse en un ciclo térmico separado de otros ensayos LymphoTrack Dx que utilizan solo 29 ciclos de PCR. La Tabla 18. siguiente resume estas diferencias de procedimiento. Para obtener instrucciones completas, consulte las Instrucciones de uso del LymphoTrack Dx Assay – MiSeq correspondiente.

Tabla 18. Configuración de ciclos y kits de reactivos para una serie de MiSeq de una sola diana

Paso del procedimiento	Descripción	LymphoTrack Dx Assay – MiSeq						
		<i>IGHV</i> Leader	<i>IGH</i> FR1	<i>IGH</i> FR2	<i>IGH</i> FR3	<i>IGK</i>	<i>TRG</i>	<i>TRB</i>
7.4.1	Número de ciclos de PCR	32	29	29	29	29	29	29
7.5.1	Volumen del reactivo AMPure XP (proporción)	50 µL (1:1)	50 µL (1:1)	50 µL (1:1)	50 µL (1:1)	50 µL (1:1)	50 µL (1:1)	35 µL (0,7:1)
7.6.4	Comprobación de contaminación Valor de $\Delta Ct = Ct (CB) - Ct (control)$	$\Delta Ct \geq 4,0$	$\Delta Ct \geq 4,0$	$\Delta Ct \geq 4,0$	$\Delta Ct \geq 4,0$	$\Delta Ct \geq 4,0$	$\Delta Ct \geq 4,0$	$\Delta Ct \geq 3,0$
7.6.5 y 7.9.1	A (longitud media de fragmento)	660 pb	450 pb	390 pb	260 pb	410 pb	300 pb	400 pb
7.10.7	Concentración de carga	12 – 20 pM	12 pM	12 pM	12 pM	8 pM	12 pM	12 pM
	Kit de reactivos de MiSeq para la secuenciación de una sola diana*	v3 (600)	v2 (500)	v2 (500)	v2 (300) v2 (500)	v2 (500)	v2 (300) v2 (500)	v2 (500)
7.12	Configuración de la hoja de muestras para: Cycles Read 1 (Lectura de ciclos 1)* Cycles Read 2 (Lectura de ciclos 2)*	301	251	251	151	251	151	251

***Nota:** Los productos químicos de MiSeq v2 se han validado para estos ensayos de una sola diana. Los productos químicos de MiSeq v3 se han validado para *IGHV* Leader y para la multiplicación de ensayos.

También pueden multiplicarse en una misma genoteca individual dos o más genotecas de secuenciación generadas a partir de ciertas mezclas maestras diana de genes de LymphoTrack (p. ej., dos genotecas de secuenciación de *TRG* del mismo o de diferentes lotes), siempre que los índices de dicha mezcla maestra solo se incluyan una vez por carrera de secuenciación. Consulte la tabla siguiente para determinar la configuración de ciclos y kits de reactivos de Illumina MiSeq que se emplean con las diferentes combinaciones de dianas. Para lograr suficientes lecturas por muestra, se recomienda utilizar el kit de reactivos MiSeq v3 para secuenciar las siete dianas juntas.

Tabla 19. Configuración de ciclos y kits de reactivos para una serie de MiSeq de varias dianas

Multiplicación de dianas	Configuración de la hoja de muestras	Kit de reactivos de MiSeq	Concentración de carga	Illumina N.º de catálogo
Solo <i>IGH</i> FR3 y <i>TRG</i> juntas	Lectura 1 de 151 ciclos Lectura 2 de 151 ciclos	Kit v2 (300 ciclos) o Kit v2 (500 ciclos) o Kit v3 (600 ciclos)	12 pM (v2) o 20 pM (v3)	MS-102-2002 o MS-102-2003
Cualquier combinación de estas dianas: <i>IGH</i> FR1, <i>IGH</i> FR2, <i>IGH</i> FR3, <i>IGK</i> , <i>TRB</i> y <i>TRG</i>	Lectura 1 de 251 ciclos Lectura 2 de 251 ciclos	Kit v2 (500 ciclos) hasta 4 dianas o Kit v3 (600 ciclos)	12 pM (v2) o 20 pM (v3)	MS-102-2003 o MS-102-3003
Al combinar cualquiera de los ensayos con <i>IGHV</i> Leader	Lectura 1 de 301 ciclos Lectura 2 de 301 ciclos	Kit v3 (600 ciclos)	20 pM (v3)	MS-102-3003

- 20.1. Determine la concentración de cada genoteca individual (p. ej., *IGHV* Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* y *TRG*).
- 20.2. Determine la cantidad de cada genoteca que se debe desnaturalizar.

En la tabla siguiente, los casos A, B, C, D, E y F son diferentes ejemplos de multiplicación de ensayos (p. ej., el caso A es una multiplicación de *IGHV* Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* y *TRG*). T, U, V, W, X, Y y Z son volúmenes en μL .

n	=	número de dianas que se cargan en un cartucho de MiSeq
T	=	40 femtomoles / [n x concentración de la genoteca de <i>IGHV</i> Leader (nM)]
U	=	40 femtomoles / [n x concentración de la genoteca de <i>IGH</i> FR1 (nM)]
V	=	40 femtomoles / [n x concentración de la genoteca de <i>IGH</i> FR2 (nM)]
W	=	40 femtomoles / [n x concentración de la genoteca de <i>IGH</i> FR3 (nM)]
X	=	40 femtomoles / [n x concentración de la genoteca de <i>IGK</i> (nM)]
Y	=	40 femtomoles / [n x concentración de la genoteca de <i>TRG</i> (nM)]
Z	=	40 femtomoles / [n x concentración de la genoteca de <i>TRB</i> (nM)]

Nota: El valor de 40 femtomoles se corresponde con los 20 μL de 2 nM al final del paso 20.3.

Tabla 20. Cálculo de entradas de la genoteca individual para generar una genoteca de secuenciación de varias dianas para la serie de MiSeq

Genoteca		Volumen de la genoteca individual (μL)						
Nombre del ensayo	Concentración (nM)		Caso A n=7	Caso B n=6	Caso C n=5	Caso D n=4	Caso E n=3	Caso F n=2
<i>IGHV</i> Leader	2,3	T	2,5	2,9	3,5	4,3		
<i>IGH</i> FR1	1,5	U	3,8	4,4	5,3	6,7	8,9	
<i>IGH</i> FR2	4	V	1,4	1,7	2	2,5	3,3	
<i>IGH</i> FR3	2,1	W	2,7	3,2	3,8	4,8	6,4	
<i>IGK</i>	3,5	X	1,6	1,9	2,3			5,7
<i>TRG</i>	2,6	Y	2,2	2,6				7,7
<i>TRB</i>	2	Z	2,9					
		T+U+V+W+X+Y+Z	17,1	16,7	16,9	18,3	18,6	13,4

- 20.3. Desnaturalice las genotecas combinadas a 2 nM.

Añada los reactivos de acuerdo con la Tabla 22, en función de la cantidad determinada en el paso anterior.

Si $T+U+V+W+X+Y+Z > 18$, como en los casos D y E de la Tabla 21, mezcle primero las genotecas aplicables y, a continuación, añada 18 μL a la reacción desnaturalizante como se muestra en la tabla siguiente.

Tabla 21. Desnaturalización de la genoteca

Reactivo	Volumen (μL)
Genoteca <i>IGHV</i> Leader	T
Genoteca <i>IGH</i> FR1	U
Genoteca <i>IGH</i> FR2	V
Genoteca <i>IGH</i> FR3	W
Genoteca <i>IGK</i>	X
Genoteca <i>TRG</i>	Y
Genoteca <i>TRB</i>	Z
NaOH, 1 N	2
10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, Tween 20 al 0,05 %	18 – (T+U+V+W+X+Y+Z)
Total	20

Agite brevemente con el agitador vortex para mezclar la solución y, a continuación, centrifugue brevemente para asegurarse de que toda la solución se haya asentado en el fondo del tubo. Incube durante 5 minutos a temperatura ambiente para desnaturalizar el ADN de la genoteca combinada en ADN monocatenario (ADNmc).

20.4. Diluya la genoteca desnaturalizada a 40 pM.

Agregue 980 μL de buffer HT1 previamente enfriado (se incluye en el kit de reactivos de MiSeq) al tubo que contiene los 20 μL de ADN de la genoteca desnaturalizada. Mezcle brevemente con el agitador vortex y centrifugue la muestra por pulsos.

20.5. Prepare la genoteca desnaturalizada para cargarla en MiSeq.

Al multiplicar (MCS v2.6 o posterior), diluya la genoteca a 12 pM para el kit de reactivos de MiSeq v2 y a 20 pM para el kit de reactivos de MiSeq v3 de acuerdo con la Tabla 22. Mezcle brevemente con el agitador vortex y centrifugue la muestra por pulsos.

Tabla 22. Preparación de la genoteca combinada para la carga en MiSeq

Reactivo	Volumen	
	12 pM	20 pM
Genoteca a 40 pM	300 μL	500 μL
Buffer HT1 enfriado	700 μL	500 μL
Total	1000 μL	1000 μL

20.6. Cargue 600 μL de la genoteca desnaturalizada combinada del paso anterior en un Reagent Cartridge (Cartucho de reactivos) de MiSeq.

20.7. Configure una hoja de muestras de MiSeq y cargue la hoja de muestras en el instrumento (si es necesario).

20.8. Inicie la serie de MiSeq.

20.9. Analice y visualice los datos adquiridos por medio del paquete LymphoTrack Dx Software – MiSeq.