

Kit Dx do amplicon personalizado TruSeq™ – FFPE QC

PARA UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO

N.º do catálogo 20006259: 1-4 usos, até 48 amostras

Uso previsto

O Kit Dx do amplicon personalizado Illumina TruSeq – FFPE QC é um conjunto de reagentes usados para determinar o potencial de amplificação do DNA genômico (gDNA) extraído de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE).

Princípios do procedimento

O Kit Dx do amplicon personalizado Illumina TruSeq – FFPE QC se destina à avaliação da qualidade de amostras de DNA de tecido FFPE para determinar se elas são viáveis para uso com o Kit Dx do amplicon personalizado TruSeq ou com outros kits de preparação de bibliotecas. O kit usa um ensaio quantitativo de PCR em tempo real (qPCR) que pode ser realizado por meio de instrumentação padrão. O qPCR determina o potencial de amplificação do DNA extraído de amostras FFPE.

Os requisitos de entrada de gDNA FFPE para a preparação da biblioteca se baseiam no ciclo quantitativo delta (dCq) obtido a partir do kit. O dCq é a diferença entre o ciclo no qual uma amostra e um controle passam por um limite. Os reagentes fornecidos no kit Dx do amplicon personalizado TruSeq – FFPE QC amplificam especificamente regiões repetidas no processamento do genoma. A quantidade de bibliotecas depende da quantidade de gDNA amplificável extraído de amostras FFPE. Quanto mais alto o dCq das amostras, mais baixa será a quantidade de gDNA amplificável e mais alta a quantidade de DNA de entrada, necessária para a preparação da biblioteca.

Limitações do procedimento

- 1 Para uso em diagnóstico *in vitro*.

Componentes do produto

O kit Dx do amplicon personalizado Illumina TruSeq – FFPE QC consiste no seguinte:

- Kit Dx do amplicon personalizado TruSeq™ – FFPE QC (N.º de catálogo 20006259)

Reagentes

Reagentes fornecidos

O Kit Dx do amplicon personalizado Illumina TruSeq – FFPE QC foi configurado para processar 48 amostras. O kit oferece suporte para quatro usos com 12 amostras por uso.

Consulte as tabelas a seguir para obter uma lista completa de reagentes fornecidos neste kit.

Kit Dx do amplicon personalizado TruSeq – FFPE QC

Tabela 1 Caixa 1, Reagentes para pré-amplificação

Componente	Quantidade	Volume de enchimento	Ingredientes ativos	Armazenamento
Mistura master de qPCR	2 tubos	1 ml	Solução tampão aquosa contendo sais, dNTPs, polimerase de DNA, referência passiva e corante verde fluorescente (SYBR)	-25 °C a -15 °C
Primers de controle de qualidade	4 tubos	75 µl	Solução tampão aquosa contendo oligonucleotídeos (primers) para qualificação de amostras de DNA	-25 °C a -15 °C

Reagentes necessários, não fornecidos

- Solução tampão 1X TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0)
- Água livre de RNase/DNase

Armazenamento e manuseio

- 1 A temperatura ambiente é definida entre 15 °C e 30 °C.
- 2 Os seguintes reagentes são remetidos congelados e permanecem estáveis quando armazenados de -25 °C a -15 °C até a data de vencimento especificada.
 - ▶ Mistura master de qPCR
 - ▶ Primers de controle de qualidade

Os reagentes permanecem estáveis durante no máximo seis ciclos de congelamento/descongelamento que ocorram antes da data de vencimento especificada.
- 3 As mudanças na aparência física dos reagentes fornecidos podem indicar deterioração dos materiais. Se ocorrerem mudanças na aparência física (por exemplo, mudanças evidentes na coloração do reagente ou turbidez aparente com contaminação microbiana), não use os reagentes.

Equipamento e materiais

Equipamento e materiais necessários, não fornecidos

Equipamento e materiais para pré-amplificação

- 1 **Centrífuga de mesa** – Uma centrífuga de mesa colocada na área do laboratório de pré ou pós-amplificação. A centrífuga deve atender às especificações a seguir.
 - ▶ Pode manter 20 °C
 - ▶ Comporta uma placa de 96 ou 384 poços
 - ▶ Aceita tubos de 5 ml
 - ▶ Alcança velocidades de 280 a 2.400 × g
- 2 **Pipetas de precisão** – É necessário um conjunto de pipetas de precisão. O uso de pipetas de precisão garante a distribuição precisa de reagentes e de amostras. Podem ser usadas pipetas de um e/ou vários canais se elas forem calibradas regularmente e tiverem uma precisão de 5% do volume declarado.
- 3 **Materiais de consumo** – Os seguintes materiais de consumo são necessários.
 - ▶ Tubos de 1,5 ml ou 2 ml
 - ▶ Tiras e tampas para 8 tubos
 - ▶ Placas PCR de 96 ou 384 poços compatíveis com o instrumento de qPCR, 0,2 ml, polipropileno ou equivalente
 - ▶ Bacia de solução, PVC, DNase, livre de RNase (cuba)
 - ▶ Vedação compatível com o instrumento de qPCR
 - ▶ Pontas de pipeta resistentes a aerossol

- 4 **Microcentrífuga**
- 5 **Agitador**
- 6 **DNA de controle de qualidade** – Peso molecular elevado, DNA humano de fita dupla disponível de fornecedores comerciais ou isolados de sangue humano.

Equipamento e materiais para pós-amplificação

- 1 **Termociclador para qPCR** – É necessário um instrumento de PCR quantitativa. O instrumento deve ter uma tampa aquecida e ter a capacidade de detectar o corante SYBR (canal FAM; filtro de excitação de ~490 nm e filtro de emissão de ~520 nm).

Avisos e precauções



CUIDADO

A lei federal restringe este dispositivo para venda por ou mediante a ordem de um médico ou outro profissional da área médica licenciado pela lei do estado no qual o mesmo atua, para uso ou designação do uso do dispositivo.



ADVERTÊNCIA

Este conjunto de reagentes contém produtos químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer ferimentos por meio de inalação, ingestão e contato com a pele e com os olhos. Use equipamento de proteção, incluindo proteção para os olhos, luvas e jaleco, apropriados para risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduos químicos e descarte-os de acordo com as leis e regulamentações regionais, nacionais e locais aplicáveis. Para obter mais informações ambientais, de saúde e de segurança, consulte a SDS em support.illumina.com/sds.html.

- 1 Manuseie todas as amostras de sangue como se fossem consideradas infecciosas para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus da hepatite B humana (HBV) e outros agentes patogênicos transmitidos pelo sangue (precauções universais).
- 2 O não cumprimento dos procedimentos conforme descritos pode resultar em resultados incorretos ou redução significativa na qualidade da amostra.
- 3 Adote precauções laboratoriais de rotina. Não faça a pipetagem com a boca. Não coma, beba ou fume em áreas de trabalho designadas. Use luvas descartáveis e jalecos para laboratório ao manusear espécimes e kits de reagentes. Lave bem as mãos depois de manusear espécimes e kits de reagentes.
- 4 Não use qualquer componente do kit após a data de vencimento declarada no rótulo da caixa do kit. Não altere os componentes do kit entre lotes diferentes de kits. Observe que os lotes de kits são identificados no rótulo da caixa do kit.
- 5 Armazene os componentes do kit à temperatura especificada nas áreas designadas de pré e pós-amplificação.
- 6 Evite ciclos de congelamento/descongelamento repetidos dos reagentes. Consulte as *Observações do procedimento na página 4* quanto ao número de usos do kit.
- 7 Para evitar a degradação das amostras ou dos reagentes, certifique-se de que todos os vapores de hipoclorito de sódio tenham se dissipado completamente antes do início do protocolo.
- 8 Práticas adequadas de laboratório e boa higiene em laboratório são necessárias para evitar que os produtos PCR contaminem reagentes, instrumentação e amostras de DNA genômico. A contaminação por PCR pode causar resultados imprecisos e não confiáveis.
- 9 Para evitar a contaminação, certifique-se de que as áreas de pré-amplificação e pós-amplificação tenham equipamento exclusivo (por exemplo, pipetas, pontas de pipeta, agitador e centrífuga).
- 10 Evite contaminação cruzada. Use pontas de pipetas novas entre as amostras e entre a distribuição de reagentes. Misture as amostras com uma pipeta e centrifugue a placa quando for indicado. Não agite as placas. O uso de pontas resistentes a aerossol reduz o risco de arraste de amplicons e de contaminação cruzada entre as amostras.
- 11 Os métodos de quantificação dependem de métodos precisos de pipetagem. Não use pipetas nos extremos das especificações de volume. Certifique-se de que as pipetas estejam calibradas.

Acrônimos

Tabela 2 Acrônimos do Kit Dx do amplicon personalizado Illumina TruSeq – FFPE QC

Acrônimo	Definição
NTC	Controle sem modelo
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa

Coleta, transporte e armazenamento de espécimes

As condições a seguir devem ser atendidas no manuseio de um tecido de tumor e do DNA extraído desse tecido.

- 1 O tecido do tumor deve ser fixado em formalina e embebido em parafina.
- 2 O gDNA extraído deve ser mantido entre 2 °C e 8 °C durante, no máximo, 28 dias, ou congelado de -25 °C a -15 °C durante, no máximo, 161 dias.
- 3 As amostras congeladas de gDNA permanecem estáveis durante dois ciclos de congelamento/descongelamento.

Extração de DNA

A Illumina recomenda kits de extração de DNA com base em coluna, usando o dobro da quantidade de Proteinase K, incubações de Proteinase K durante a noite, com agitação e eluições finais em um volume de, pelo menos, 30 µl. Os métodos de extração baseados em beads, que usam apenas a dissolução de extratos não processados de células, não são recomendados para uso com esses reagentes.



OBSERVAÇÃO

Não foi observado qualquer efeito adverso no desempenho do kit com tecido FFPE quando estavam presentes quantidades residuais de solução de desparafinização, cera de parafina, xileno, etanol, Proteinase K, soluções de limpeza, hemoglobina ou tecido necrosado.

Observações do procedimento

- 1 O kit poderá ser usado até quatro vezes se menos de 96 amostras forem testadas.
- 2 A Illumina determina que seja incluído um controle negativo (NTC ou controle sem modelo) em cada uso.
- 3 Qualifique o DNA usando o Kit Dx do amplicon personalizado Illumina TruSeq – FFPE QC, conforme descrito nas *Instruções de uso*. O rendimento da biblioteca e o desempenho do sequenciamento dependem da qualidade da amostra, conforme medido pelo Kit Dx do amplicon personalizado Illumina TruSeq – FFPE QC.

Instruções de uso

Preparação

- 1 Deixe o DNA de controle de qualidade, os primers de CQ, a mistura master de PCR e o gDNA em temperatura ambiente.
- 2 Agite vigorosamente os primers de CQ e centrifugue ligeiramente os tubos para coletar o líquido.
- 3 Inverta o DNA de controle, o gDNA e a mistura master de qPCR 10 vezes e centrifugue ligeiramente os tubos para coletar o líquido.
- 4 Coloque todos os tubos em gelo e proteja a mistura master de qPCR da luz ambiente.
- 5 Determine o layout da placa da reação de qPCR (use a [Figura 1 na página 5](#) como guia).

Procedimento

- 1 Prepare o DNA de controle de qualidade escolhendo uma das seguintes opções:
 - ▶ **[Opção 1] gDNA comercialmente disponível** – Dilua o DNA com base na concentração indicada pelo fornecedor. Prepare pelo menos 50 µl de DNA de controle de qualidade em uma concentração de 0,25 ng/µl usando solução tampão 1X TE.
 - ▶ **[Opção 2] gDNA extraído** – Determine a concentração com um espectrofotômetro e solução tampão 1X TE Buffer como branco. Meça a amostra de gDNA em triplicata. O % de CV deve ser menor ou igual a 20%. Repita as leituras da amostra se o % de CV for superior a 20%. Prepare pelo menos 50 µl de DNA de controle de qualidade diluídos na hora em 0,25 ng/µl usando solução tampão 1X TE.
- 2 Determine o layout da placa da reação de qPCR (**Figura 1**). Teste o DNA de controle, NTC e cada amostra de gDNA em triplicata. Para calcular o número de poços, execute a etapa a seguir:
 - ▶ Número total de poços = 3 × [1 (DNA de controle) + 1 (NTC) + n.º de amostras de gDNA]
- 3 Em uma tira de 8 tubos de PCR, combine 148,5 µl de solução tampão 1X TE e 1,5 µl de amostra de gDNA para formar uma diluição de 100 vezes.
- 4 Com uma pipeta multicanal P200 ajustada para 100 µl, pipete para cima e para baixo 10 vezes para misturar as diluições.
- 5 Transfira 30 µl de 0,25 ng/µl de diluição de DNA de controle para um poço não utilizado na tira de 8 tubos de PCR.

Figura 1 Layout sugerido da placa para qPCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Amostra 1	Amostra 1	Amostra 1	Amostra 9	Amostra 9	Amostra 9						
B	Amostra 2	Amostra 2	Amostra 2	Amostra 10	Amostra 10	Amostra 10						
C	Amostra 3	Amostra 3	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 11	Amostra 11						
D	Amostra 4	Amostra 4	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 12	Amostra 12						
E	Amostra 5	Amostra 5	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 13	Amostra 13						
F	Amostra 6	Amostra 6	Amostra 6	Amostra 14	Amostra 14	Amostra 14						
G	Amostra 7	Amostra 7	Amostra 7	DNA de controle	DNA de controle	DNA de controle						
H	Amostra 8	Amostra 8	Amostra 8	NTC	NTC	NTC						

- 6 Adicione 150 µl de solução tampão 1X TE a outro poço não utilizado para usar como o NTC.
- 7 Tampe as tiras de 8 tubos e centrifugue ligeiramente para coletar o líquido.
- 8 Prepare uma quantidade suficiente de mistura de reação de qPCR para um formato de placa com 384 poços ou 96 poços com base no número de reações determinado na etapa 2. A **Tabela 3** indica os volumes de cada componente para uma única reação. Adicione um volume extra para erro de pipetagem.

Tabela 3 Mistura de reação de qPCR

Componente da mistura de reação	Vol. de 384 poços (µl)	Vol. de 96 poços (µl)
Mistura master de qPCR	5	10
Primers de controle de qualidade	0,8	1,6

Componente da mistura de reação	Vol. de 384 poços (µl)	Vol. de 96 poços (µl)
Água	2,2	4,4
Vol. da mistura de reação por poço	8	16
Amostra	2	4
Vol. total da reação por poço	10	20

- 9 Misture a reação com cuidado, mas completamente. Centrifugue ligeiramente para coletar o líquido. Coloque a mistura da reação em gelo e proteja-a da luz até o uso.
- 10 Divida a mistura da reação em partes iguais em uma cuba ou em uma tira de 8 tubos para ajudar a distribuir com a pipeta multicanal.
- 11 Adicione 8 µl (formato de 384 poços) ou 16 µl (formato de 96 poços) da mistura de reação de qPCR a cada poço de amostra da placa de qPCR.

**CUIDADO**

Certifique-se de pipetar com precisão; pequenas variações afetarão o ensaio.

- 12 Adicione 2 µl (formato de 384 poços) ou 4 µl (formato de 96 poços) de 0,25 ng/µl de diluição de DNA de controle, as diluições de amostra de gDNA, ou solução tampão 1X TE a cada poço da placa (consulte a [Figura 1](#) para obter sugestões).

**CUIDADO**

Certifique-se de pipetar com precisão; pequenas variações afetarão o ensaio.

- 13 Com uma pipeta multicanal P20 com a metade do volume total de reação (5 µl para uma placa de 384 poços ou 10 µl para uma placa de 96 poços), pipete lentamente para cima e para baixo três vezes para misturar.
- 14 Vede a placa com um selo opticamente transparente, com cuidado para evitar contaminação cruzada e evitar sujar a superfície da vedação.
- 15 Centrifugue a placa a 1.000 g a 20 °C durante 1 minuto.
- 16 Certifique-se de que o selo e a placa estejam livres de qualquer líquido ou pó, coloque a placa no instrumento de qPCR na orientação correta e depois feche a tampa e execute o seguinte perfil térmico de qPCR (com uma tampa aquecida):
 - ▶ 50 °C durante 2 minutos
 - ▶ 95 °C durante 10 minutos
 - ▶ 40 ciclos de:
 - ▶ 95 °C durante 30 segundos
 - ▶ 57 °C durante 30 segundos
 - ▶ 72 °C durante 30 segundos
- 17 Confirme se o instrumento captura as imagens depois da etapa de 72 °C na etapa 16.
- 18 Divida o valor de Cq das reações triplicadas do DNA de controle, NTC e de cada amostra. Trate os valores atípicos conforme especificado nos [Procedimentos de controle de qualidade na página 7](#).
- 19 Subtraia a média Cq do DNA de controle da média Cq de cada amostra (Cq da média de amostras menos Cq da média do DNA de controle) para produzir os valores de dCq de cada amostra. Registre os valores dCq, todas as réplicas que foram excluídas e os fatores de diluição da amostra. Para amostras com dCq ≤ -1,5, dilua a amostra 16 vezes e repita a medida de dCq até que o valor seja >-1,5. Para a preparação de bibliotecas usando o kit Dx TSCA, siga as instruções de diluição da amostra para o grupo aplicável:
 - ▶ -1,5 < dCq ≤ -0,5, dilua a amostra oito vezes
 - ▶ -0,5 < dCq ≤ 0,5, dilua a amostra quatro vezes
 - ▶ 0,5 < dCq ≤ -1,5, dilua a amostra duas vezes
 - ▶ 1,5 < dCq ≤ 4, use amostra não diluída
 - ▶ dCq > 4, não use amostra

PONTO DE INTERRUÇÃO SEGURO

Os valores de dCq serão válidos por 28 dias se as amostras de DNA forem armazenadas de 2 °C a 8 °C; eles serão válidos por 161 dias se as amostras de DNA forem armazenadas de -25 °C a -15 °C.

Procedimentos de controle de qualidade

- Um DNA de controle de qualidade e um controle negativo (sem modelo) estão incluídos em cada execução de qPCR de qualificação. O modelo de DNA de controle de qualidade é usado para normalizar os dados de qPCR.
- Depois da última etapa, o instrumento de qPCR analisa as amostras quantificadas. Se a amplificação do NTC ocorrer dentro de 10 ciclos da amplificação de DNA de controle de qualidade, é provável que haja contaminação das amostras e o teste deverá ser repetido.
- Certifique-se de que o DNA de controle de qualidade produza as curvas de amplificação esperadas. Amplifique o DNA de controle de qualidade a um Cq de aproximadamente 15 a 22 ciclos. Exclua as réplicas de um grupo triplicado que seja >0,5 Cq diferente do restante do grupo.
- Exclua as réplicas que exibam curvas anormais de amplificação. Pelo menos duas das três réplicas devem ser incluídas no cálculo final para uma amostra individual ou o processo de qualificação deverá ser repetido para essas amostras.
- Se quatro ou mais amostras por execução de 10 amostras tiverem réplicas removidas, repita o processo de qualificação de todas as amostras.

Características de desempenho

A Tabela 4 mostra os valores de Cq de gDNA a 0,25 ng/μl de cinco fornecedores comerciais (B, C, P, R e T) ou extraído de uma amostra de sangue total. Um material de referência do NIST na mesma concentração é mostrado para fins de comparação. Os valores de Cq são provenientes de três operadores independentes e três plataformas de qPCR independentes (A, B, S). Os resultados mostram a média ± desvio padrão. O instrumento B mostra um aumento consistente de Cq com relação aos instrumentos A e S; as amostras normalizadas pelo DNA de controle de qualidade apresentaram valores consistentes de dCq em todos os instrumentos (dados não mostrados).

Tabela 4 Valores de Cq do DNA de controle de qualidade originário de fornecedores ou extraído do sangue

Instrumento de qPCR	NIST do sexo masculino 2372	Fornecedor B	Fornecedor C	Fornecedor P	Fornecedor R	Fornecedor T	Extraído
Instrumento A	18,87 +/- 0,07	19,14 +/- 0,14	18,79 +/- 0,13	19,11 +/- 0,17	19,07 +/- 0,12	19,03 +/- 0,17	18,78 +/- 0,07
Instrumento B	20,47 +/- 0,09	20,75 +/- 0,12	20,43 +/- 0,12	20,71 +/- 0,19	20,71 +/- 0,06	20,69 +/- 0,15	20,46 +/- 0,09
Instrumento S	19,06 +/- 0,10	19,39 +/- 0,13	18,99 +/- 0,14	19,29 +/- 0,16	19,31 +/- 0,10	19,24 +/- 0,15	19,08 +/- 0,16

Patentes e marcas comerciais

Este documento e seu conteúdo são de propriedade da Illumina, Inc. e de suas afiliadas (“Illumina”) e destinam-se exclusivamente ao uso contratual de seu cliente com relação ao uso dos produtos descritos neste documento e para nenhuma outra finalidade. Este documento e seu conteúdo não devem ser usados ou distribuídos para qualquer outra finalidade ou ser comunicados, divulgados ou reproduzidos de qualquer forma sem o consentimento prévio por escrito da Illumina. A Illumina não concede qualquer licença sob seus direitos de patente, marca comercial, direitos autorais ou lei comum ou direitos semelhantes de terceiros por meio deste documento.

As instruções neste documento devem ser estrita e explicitamente seguidas por pessoal devidamente treinado e qualificado para garantir o uso adequado e seguro dos produtos descritos neste documento. Todo o conteúdo deste documento deve ser lido e compreendido por completo antes do uso de tais produtos.

NÃO LER COMPLETAMENTE E NÃO SEGUIR EXPLICITAMENTE TODAS AS INSTRUÇÕES AQUI CONTIDAS PODE RESULTAR EM DANOS AO(S) PRODUTO(S), FERIMENTOS A PESSOAS, INCLUSIVE USUÁRIOS OU OUTROS, E DANOS A OUTROS BENS, ANULANDO QUALQUER GARANTIA APLICÁVEL AO(S) PRODUTO(S).

A ILLUMINA NÃO SE RESPONSABILIZA POR QUALQUER PROBLEMA CAUSADO PELO USO INDEVIDO DO(S) PRODUTO(S) MENCIONADO(S) ACIMA (INCLUINDO PARTES SEPARADAS OU O SOFTWARE).

© 2021 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

AMPure, Beckman e Beckman Coulter são marcas comerciais ou marcas comerciais registradas da Beckman Coulter, Inc.

Informações de contato



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Califórnia 92122, EUA
+1.800.809.ILMN (4566)
+1 (858) 202-4566 (fora da América do Norte)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Países Baixos

Patrocinador australiano
Illumina Australia Pty Ltd
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
Austrália

Rotulagem do produto

Para uma referência completa dos símbolos que possam aparecer na embalagem e rotulagem do produto, confira a lista de símbolos em support.illumina.com na aba de *Documentação e literatura* para seu kit.