

MiSeq™ Dx Reagent Kit v3

PARA UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO

Utilização prevista

O Illumina MiSeqDx Reagent Kit v3 é um conjunto de reagentes e consumíveis que se destinam à sequenciação de bibliotecas de amostras quando usados com ensaios validados. O MiSeqDx Reagent Kit v3 destina-se a ser utilizado com o instrumento MiSeqDx e software de análise.

Princípios do procedimento

Para a sua entrada, o MiSeqDx Reagent Kit v3 utiliza as bibliotecas preparadas do ADN onde são adicionados os índices de amostras e as sequências de captura aos alvos. As bibliotecas de amostra são capturadas numa célula de fluxo e sequenciadas no instrumento, utilizando a química de sequenciação por síntese (SBS, sequencing by synthesis). A química SBS utiliza um método de terminador reversível para detetar bases únicas de nucleótidos com identificação fluorescente à medida que são incorporadas em cadeias de ADN crescentes.

Consulte o folheto informativo do MiSeqDx Instrument da sua região e a versão do software do instrumento para obter informações sobre a realização de sequenciações no MiSeqDx Instrument.

Limitações do procedimento

- Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- As limitações descritas neste folheto informativo são baseadas em ensaios representativos e módulos do software, incluindo os Local Run Manager Germline Variant and Somatic Variant Modules, que foram desenvolvidos com o objetivo de avaliar o desempenho com ensaios representativos.
- Leituras com inserções, eliminações ou combinações (Indels).
O conteúdo com tamanho > 25 bp não é alinhado pelo Assay Software. Consequentemente, Indels com tamanho > 25 pares de bases (bp) não são detetáveis pelo Assay Software.
- O sistema foi validado para a deteção de variantes únicas de nucleótido (SNV, single nucleotide variants) e eliminações até 25 bp e inserções até 24 bp quando utilizado com o Germline and Somatic Variant module software. Para a identificação com o Somatic, a uma frequência de variantes de 0,05, foram detetadas eliminações de 25 bp e inserções de 18 bp.

- O Assay Software pode não alinhar leituras amplicon com conteúdo extremo de variantes, resultando na definição da região a reportar como selvagem. O conteúdo extremo inclui:
 - Leituras que contenham mais de três Indels
 - Leituras com um tamanho de pelo menos 30 bp com conteúdo de SNV > 4% do tamanho total do alvo de amplicon (excluindo regiões de investigação)
 - Leituras com tamanho < 30 bp com conteúdo SNV > 10% do tamanho total de amplicon (incluindo regiões de investigação)
- Variantes maiores, incluindo variantes multinucleótidos (MNV, multi-nucleotide variants) e Indels grandes, podem ser reportadas como variantes separadas mais pequenas no ficheiro de saída VCF.
- É possível ignorar ou filtrar variantes de eliminação ao cruzar dois amplicons cobertos se o tamanho da eliminação for superior ou igual à sobreposição entre os amplicons cobertos.
- O sistema não consegue detetar Indels se ocorrerem diretamente adjacentes a um primer e se não houver um fragmento amplificado de sobreposição. Para as regiões com fragmentos amplificados de sobreposição, o ensaio não consegue detetar eliminações quando a região de sobreposição é mais pequena do que o tamanho da eliminação a ser detetada. Por exemplo, se a região da sobreposição entre dois amplicons adjacentes for duas bases, o ensaio não consegue detetar nenhuma eliminação incluindo ambas as bases. A eliminação de uma base única em cada uma dessas bases pode ser detetada.
- Tal como com qualquer fluxo de trabalho de preparação de bibliotecas à base de hibridização, os polimorfismos, mutações, inserções ou eliminações subjacentes em regiões de ligação oligonucleótida podem afetar os alelos investigados e, conseqüentemente, as identificações obtidas durante a sequenciação. Por exemplo:
 - Uma variante na fase com uma variante na região do primer pode não ser amplificada, resultando num falso negativo.
 - As variantes na região do primer podem impedir a amplificação do alelo de referência, resultando numa identificação incorreta de variante homozigótica.
 - As variantes Indel na região do primer podem causar um falso positivo no fim da leitura adjacente ao primer.
- Os Indels podem ser filtrados devido à tendência da cadeia se ocorrerem perto do fim de uma leitura e se forem levemente recortados durante o alinhamento.
- MNV pequenas podem não ter sido validadas e só são reportadas no Somatic Variant Module.
- As eliminações são reportadas no VCF na coordenada que antecede a base de acordo com o formato VCF. Assim, devem ser consideradas as variantes adjacentes antes de reportar que uma identificação individual de base é referência homozigótica.

- Limitações específicas do Germline:
 - O MiSeqDx Instrument, utilizando o módulo Germline Variant do Local Run Manager, foi concebido para fornecer resultados qualitativos para a identificação da variante da linha germinal (p. ex., homozigótica, heterozigótica, tipo selvagem).
 - Quando utilizado com o Germline Variant Module, a cobertura mínima por amplicon necessária para uma identificação de variantes precisa é de 150x. Como resultado, são necessários 150 fragmentos de ADN, que são equivalentes a 300 leituras de sobreposição de extremidade emparelhada. O número de amostras e o número total de bases alvo afetam a cobertura. O conteúdo GC (guanina-citosina) e outro conteúdo genómico podem afetar a cobertura.
 - O número de cópia da variação pode afetar a identificação de uma variante como homozigótica ou heterozigótica.
 - As variantes de alguns contextos repetitivos são filtradas nos ficheiros VCF. O filtro de repetição RMxN é utilizado para filtrar variantes se a sequência da variante estiver presente total ou parcialmente repetidamente no genoma de referência adjacente à posição da variante. Para identificação de variantes de linha germinal, são necessárias pelo menos nove repetições em referência para que uma variante seja filtrada e apenas as repetições com 5 bp são consideradas (R5x9).
- Limitações específicas do Somatic:
 - O instrumento MiSeqDx, utilizando o Local Run Manager Somatic Variant Module, foi concebido para fornecer resultados qualitativos para a identificação da variante somática (p. ex., presença de uma variante somática com uma frequência de variante $\geq 0,026$ com um limite de deteção de 0,05).
 - Quando utilizado com o Somatic Variant Module, a cobertura mínima por amplicon necessária para uma identificação de variantes precisa é de 450x por pool de oligonucleóticos. Como resultado, são necessários 450 fragmentos de ADN por pool de oligonucleóticos, que são equivalentes a 900 leituras de sobreposição de extremidade emparelhada. O número de amostras e o número total de bases alvo afetam a cobertura. O conteúdo GC (guanina-citosina) e outro conteúdo genómico podem afetar a cobertura.
 - Para identificação de variantes somáticas, são necessárias pelo menos seis repetições em referência para que uma variante seja filtrada e apenas as repetições com 3 bp são consideradas (R3x6).
 - O Somatic Variant Module não consegue distinguir entre variantes de linha germinal e somáticas. O módulo foi concebido para detetar variantes ao longo de um intervalo de frequências de variantes, mas a frequência de variantes não pode ser utilizada para distinguir entre variantes somáticas e variantes de linha germinal.
 - O tecido normal na amostra afeta a deteção de variantes. O limite de deteção reportado é baseado numa frequência de variantes relativa ao ADN total extraído de tecido tumoral e tecido normal.

Componentes do produto

O Illumina MiSeqDx Reagent Kit v3, com n.º de catálogo 20037124, é composto pelo seguinte:

- Tampão de diluição de bibliotecas, célula de fluxo e reagentes pós-amp

Reagentes fornecidos

O MiSeqDx Reagent Kit v3 da Illumina é um conjunto de utilização única de reagentes e consumíveis para sequenciar um ensaio de uma ou mais bibliotecas de amostras no instrumento MiSeqDx. O número de bibliotecas de amostras depende da multiplexagem suportada pelo método de preparação de bibliotecas ascendente.

Consulte as tabelas seguintes para uma lista completa dos reagentes fornecidos neste kit.

MiSeqDx Reagent Kit v3, Box 1

Tabela 1 Box 1 Post-Amp Reagents

Componente	Quantidade	Volume de enchimento	Substâncias ativas	Armazenamento
Tampão de diluição de bibliotecas	1 tubo	4,5 ml	Solução aquosa tamponada	-25 °C a -15 °C
MiSeqDx Reagent v3 Cartridge (RFID-labeled)	1 cada	Vários	Cartucho previamente cheio e de utilização única	-25 °C a -15 °C

MiSeqDx Reagent Kit v3, Box 2

Tabela 2 Box 2 Post-Amp Reagents

Componente	Quantidade	Volume de enchimento	Substâncias ativas	Armazenamento
MiSeqDx SBS Solution (PR2) (RFID-labeled)	1 frasco	500 ml	Solução aquosa tamponada	2 °C a 8 °C

Componente	Quantidade	Volume de enchimento	Substâncias ativas	Armazenamento
MiSeqDx Flow Cell (RFID-labeled)	1 cada	N/D	Célula de fluxo de vidro, de extremidade emparelhada e utilização única em solução aquosa tamponada	2 °C a 8 °C

Armazenamento e manuseamento

- A temperatura ambiente é definida entre 15 °C a 30 °C.
- Os reagentes que se seguem são enviados congelados e são estáveis quando estão armazenados entre -25 °C e -15 °C até à data de validade especificada.
 - Tampão de diluição de bibliotecas
 - Cartucho de reagentes MiSeqDx v3

NOTA: O Tampão de diluição de bibliotecas e o Cartucho de reagentes MiSeqDx v3 são apenas de utilização única e são estáveis durante um descongelamento, no máximo, e à temperatura ambiente antes da data de validade especificada. Depois de descongelado, o cartucho de reagentes deve ser carregado com a biblioteca de amostras e o ensaio deve ser realizado imediatamente no instrumento MiSeqDx. Alternativamente, o cartucho de reagentes descongelado pode ser mantido entre 2 °C e 8 °C durante, no máximo, 6 horas e, em seguida, deve ser carregado com a biblioteca de amostras e o ensaio deve ser realizado imediatamente no instrumento MiSeqDx.

- Os reagentes que se seguem são enviados refrigerados e são estáveis quando estão armazenados entre 2 °C e 8 °C até à data de validade especificada.
 - MiSeqDx SBS Solution (PR2)
 - MiSeqDx Flow Cell
 A Solução SBS MiSeqDx (PR2) e a Célula de fluxo MiSeqDx são apenas de utilização única.
- As alterações ao aspeto físico dos reagentes pode indicar a deterioração dos materiais. Se ocorrerem alterações no aspeto físico (p. ex., alterações óbvias na cor ou turvação evidente do reagente podem indicar contaminação microbiana), não utilize os reagentes.

Equipamento e materiais necessários, vendidos em separado

- **Instrumento MiseqDx**, Catálogo n.º DX-410-1001

Avisos e precauções



ATENÇÃO

A Lei Federal limita este dispositivo a prescrição médica ou de outro profissional com licença para exercer de acordo com a legislação do Estado onde exerce, para utilizar ou prescrever este dispositivo.



AVISO

Este conjunto de reagentes contém químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer lesões pessoais por inalação, ingestão, contacto da pele e contacto ocular. Use equipamento de proteção, incluindo proteção ocular, luvas e bata de laboratório adequados para o risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduos químicos e elimine-os de acordo com a legislação e os regulamentos locais, regionais e nacionais aplicáveis. Para informações adicionais ambientais, de segurança e de saúde, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) em support.illumina.com/sds.html.

(Consulte Reagentes na página 1 para mais informações.)

- O não seguimento dos procedimentos da forma descrita poderá resultar em resultados erróneos ou na redução significativa da qualidade das amostras.
- Aplique as precauções de rotina do laboratório. Não coloque a pipeta na boca. Não coma, beba ou fume nas áreas designadas para trabalho. Use luvas descartáveis e batas de laboratório quando manusear amostras e reagentes de ensaio. Lave bem as mãos depois de manusear amostras e reagentes de ensaio.
- É necessário que sejam implementadas as devidas práticas laboratoriais e as boas práticas de higiene laboratorial para evitar que os produtos PCR contaminem reagentes, instrumentos e amostras genómicas de ADN. A contaminação PCR pode causar resultados imprecisos e não fiáveis.
- Para prevenir a contaminação, certifique-se de que as áreas de pré e pós-amplificação têm equipamento dedicado (p. ex., pipetas, pontas de pipeta, agitador por vórtice e centrífuga).

- O emparelhamento entre os índices e amostras tem de corresponder exatamente à impressão da disposição das placas. O Local Run Manager preenche automaticamente os primers de indexação associados aos nomes das amostras, quando introduzidas no módulo. Confirme se os primers de indexação são associados às amostras antes de iniciar o ensaio de sequenciação. As divergências entre a impressão da disposição das placas e a amostra resultará na perda da identificação positiva da amostra e em relatórios com resultados incorretos.
- Comunique imediatamente quaisquer incidentes graves relacionados com este produto à Illumina e às autoridades competentes dos Estados-membros nos quais o utilizador e/ou o paciente estão estabelecidos.

Instruções de utilização

Consulte o folheto informativo do MiSeqDx Instrument da sua região e a versão do software do instrumento.

Características de desempenho

Consulte o folheto informativo do MiSeqDx Instrument da sua região e a versão do software do instrumento.

Histórico de revisão

Documento n.º	Data	Descrição da alteração
Documento n.º 1000000030849 v04	Novembro de 2021	Foram atualizadas as referências do folheto informativo do MiSeqDx Instrument. Foram atualizadas, com clarificações adicionais, as Limitações do procedimento e os Avisos e precauções. Foram realizadas pequenas atualizações para assegurar o estilo e os padrões de documentação da Illumina.
Documento n.º 1000000030849 v03	Agosto de 2021	Foi atualizada a morada do Representante autorizado na UE. Foi adicionada a tabela do Histórico de revisões.

Patentes e marcas comerciais

Este documento e respetivo conteúdo são propriedade da Illumina, Inc. e das suas afiliadas ("Illumina") e destinam-se unicamente a utilização contratual por parte dos clientes relativamente à utilização dos produtos descritos no presente documento e para nenhum outro fim. Este documento e respetivo conteúdo não podem ser utilizados ou distribuídos para qualquer outro fim e/ou de outra forma transmitidos, divulgados ou reproduzidos por qualquer via, seja de que natureza for, sem a autorização prévia por escrito da Illumina. A Illumina não concede qualquer licença ao abrigo da sua patente, marca comercial, direito de autor ou direitos de jurisprudência nem direitos semelhantes de quaisquer terceiros por via deste documento.

As instruções contidas neste documento têm de ser estrita e explicitamente seguidas por pessoal qualificado e com a devida formação para garantir a utilização adequada e segura dos produtos aqui descritos. Todo o conteúdo deste documento tem de ser integralmente lido e compreendido antes da utilização dos referidos produtos.

A NÃO OBSERVÂNCIA DA RECOMENDAÇÃO PARA LER INTEGRALMENTE E SEGUIR EXPLICITAMENTE TODAS AS INSTRUÇÕES AQUI CONTIDAS PODE RESULTAR EM DANOS NOS PRODUTOS, LESÕES EM PESSOAS, INCLUINDO NOS UTILIZADORES OU OUTROS, E EM DANOS MATERIAIS, E IRÁ ANULAR QUALQUER GARANTIA APLICÁVEL AOS PRODUTOS.

A ILLUMINA NÃO ASSUME QUALQUER RESPONSABILIDADE RESULTANTE DA UTILIZAÇÃO INADEQUADA DOS PRODUTOS AQUI DESCRITOS (INCLUINDO PARTES DOS MESMOS OU DO SOFTWARE).

© 2021 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

Todas as marcas comerciais são propriedade da Illumina, Inc. ou dos respetivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

Informações de contacto



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

Etiquetas do produto

Para uma referência completa dos símbolos que podem ser apresentados nas embalagens e etiquetas do produto, consulte a chave de símbolos para o seu kit em support.illumina.com.