

Kit de reactivos MiSeqDx v. 3

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

Catálogo n.º 20012552 o 20037124 : un experimento

Uso previsto

El kit de reactivos MiSeqDx™ v. 3 de Illumina es un conjunto de reactivos y consumibles que se utiliza para la secuenciación de bibliotecas de muestras en ensayos validados. El kit de reactivos MiSeqDx v. 3 está diseñado para su uso con el instrumento MiSeqDx y software de análisis.

Principios de procedimiento

El kit de reactivos MiSeqDx v. 3 emplea en sus entradas bibliotecas que se han preparado con ADN y en las que los índices de las muestras y las secuencias de captura se han añadido a los objetivos. Las bibliotecas de muestras se capturan en una celda de flujo y se secuencian en el instrumento por medio de la química de secuenciación por síntesis (SBS). La química de SBS utiliza un método basado en terminadores reversibles para detectar bases de nucleótidos únicos en la incorporación a las cadenas de ADN en crecimiento.

El prospecto del instrumento MiSeqDx (documento con n.º de referencia 1000000021963) ofrece las instrucciones necesarias para llevar a cabo la secuenciación en el instrumento MiSeqDx.

Limitaciones del procedimiento

- 1 Para uso diagnóstico *in vitro*.
- 2 Lecturas que incluyen inserciones, deleciones o combinaciones de ambas (inserciones y deleciones). El software del ensayo no alineará el contenido cuya longitud sea superior a 25 pares de bases. Por lo tanto, el software del ensayo no detectará las inserciones y deleciones con una longitud superior a los 25 pares de bases.
- 3 El sistema se ha validado para detectar variantes de nucleótido único (SNV) con un máximo de deleciones de 25 pares de bases y un máximo de inserciones de 24 pares de bases siempre que se utilice con el software de los módulos Germline y Somatic Variant (Variante somática). En las llamadas de variantes somáticas se detectaron deleciones de 25 pb e inserciones de 18 pb con una frecuencia de variantes de 0,05.
- 4 Es posible que el software del ensayo no alinee las lecturas de amplicones que contienen una cantidad excesiva de variantes y, en consecuencia, se catalogará la región como de estado natural. El contenido excesivo incluye:
 - ▶ Lecturas que contienen más de tres inserciones y deleciones
 - ▶ Lecturas cuya longitud es de, al menos, 30 pares de bases y cuyo contenido de SNV es superior al 4 % de la longitud total del amplicón objetivo (sin tener en cuenta las regiones de sonda)
 - ▶ Lecturas cuya longitud es inferior a los 30 pares de bases y cuyo contenido de SNV es superior al 10 % de la longitud total del amplicón (incluidas las regiones de sonda)
- 5 Es posible que las variantes de mayor tamaño, incluidas las variantes de nucleótidos múltiples (MNV) y las inserciones y deleciones de gran tamaño, aparezcan en el archivo VCF de resultados por separado como variantes de menor tamaño.
- 6 Cuando se cubren dos amplicones en la placa, es posible que las variantes de deleción se omitan o queden filtradas si la longitud de la deleción es mayor o igual que la región de solapamiento entre los amplicones de la placa.
- 7 El sistema no puede detectar inserciones y deleciones si son directamente adyacentes a un cebador y no existe solapamiento de amplicones. Con respecto a las regiones con solapamiento de amplicones, el ensayo no puede detectar deleciones cuando la región de solapamiento es más pequeña que la deleción que se desea detectar. Por ejemplo, si la región de solapamiento entre dos amplicones adyacentes tiene dos bases, el ensayo no puede detectar deleciones que incluyan esas dos bases. Se puede detectar una deleción de una sola base en cualquiera de esas dos bases.

- 8 Como con cualquier flujo de trabajo de preparación de bibliotecas basado en hibridación, los polimorfismos, las mutaciones, las inserciones o las deleciones subyacentes en regiones de unión de oligonucleótidos pueden afectar a los alelos que se comprueban y, en consecuencia, a las llamadas que se han realizado durante la secuenciación. Por ejemplo:
 - ▶ Una variante en fase que contiene una variante en la región del cebador es posible que no se amplifique, lo que conllevaría un falso negativo.
 - ▶ Es posible que las variantes que se sitúan en la región del cebador impidan la amplificación del alelo de referencia, lo que conllevaría una llamada de variantes homocigóticas errónea.
 - ▶ Las variantes de deleciones e inserciones que se encuentran en la región del cebador pueden provocar un falso positivo en la llamada en la parte final de la lectura de las posiciones adyacentes a un cebador.
- 9 Las inserciones y deleciones pueden quedar filtradas a causa de cortes en la cadena si están situadas en la parte final de una lectura y se han truncado levemente durante la alineación.
- 10 Las variantes MNV de menor tamaño no se han validado y solo se identifican en el módulo Somatic Variant (Variante somática).
- 11 Las deleciones se identifican en la coordenada de la base precedente de cada formato VCF; por lo tanto, se deben considerar las variantes adyacentes antes de identificar una llamada de bases individual como una referencia homocigótica.
- 12 Limitaciones específicas de Germline:
 - ▶ El instrumento MiSeqDx que utiliza el módulo Germline Variant (Variante Germline) de Local Run Manager se ha concebido para ofrecer resultados cualitativos en lo que se refiere a las llamadas de variantes Germline (por ejemplo, homocigóticas, heterocigóticas y en estado natural).
 - ▶ Para utilizar el módulo Germline Variant (Variante Germline) es necesaria una cobertura mínima de 150× por amplicón para que la llamada de variantes sea precisa. Por lo tanto, se precisan 150 fragmentos con ADN, lo que equivale a 300 lecturas "paired-end" solapadas. La cantidad de muestras y el número total de bases que se van a estudiar influirán en la cobertura. El contenido de GC, así como otros contenidos genómicos, también influyen en la cobertura.
 - ▶ La variación en el número de copias puede influir en la identificación de una variante como homocigótica o heterocigótica.
 - ▶ Las variantes que se encuentran en un contexto repetitivo determinado se filtran en los archivos VCF. El filtro RMxN para las repeticiones se utiliza para filtrar variantes en caso de que la secuencia de la variante aparezca varias veces, en parte o en su totalidad, en el genoma de referencia adyacente a la posición de la variante. En el caso de las llamadas de variante Germline, es necesario que existan al menos nueve repeticiones en la referencia para que se filtre la variante, y únicamente se tienen en cuenta las repeticiones con una longitud de hasta cinco pares de bases (R5x9).
- 13 Limitaciones específicas para variantes somáticas:
 - ▶ El sistema MiSeqDx que utiliza el módulo Somatic Variant (Variante somática) de Local Run Manager se ha concebido para ofrecer resultados cualitativos en lo que se refiere a las llamadas de variantes somáticas (por ejemplo, la presencia de una variante somática con una frecuencia de variante mayor o igual a 0,026 con un límite de detección de 0,05).
 - ▶ Para utilizar el módulo Somatic Variant (Variante somática) es necesaria una cobertura mínima por amplicón de 450× por grupo de oligonucleótidos para que la llamada de variantes sea precisa. Por lo tanto, se precisan 450 fragmentos con ADN por grupo de oligonucleótidos, lo que equivale a 900 lecturas "paired-end" solapadas. La cantidad de muestras y el número total de bases que se van a estudiar influirán en la cobertura. El contenido GC, así como otros contenidos genómicos, también influyen en la cobertura.
 - ▶ En el caso de las llamadas de variante somática, es necesario que existan al menos seis repeticiones en la referencia para que se filtre la variante, y únicamente se tienen en cuenta las repeticiones con una longitud de hasta tres pares de bases (R3x6).
 - ▶ El módulo Somatic Variant (Variante somática) no es capaz de diferenciar entre las variantes Germline y las variantes somáticas. Aunque el módulo se ha diseñado para detectar las variantes dentro de un espectro de frecuencias de variantes, no es posible utilizar las frecuencias para diferenciar las variantes Germline de las somáticas.

- ▶ El tejido común que se encuentre en la muestra puede influir en la detección de las variantes. El límite de detección se basa en una frecuencia de variante relativa al total de ADN que se ha extraído del tumor y del tejido común.

Componentes del producto

El kit de reactivos MiSeqDx v. 3 de Illumina contiene lo siguiente:

- ▶ Tampón de dilución de biblioteca, celda de flujo y reactivos de posamplificación

Reactivos

Reactivos suministrados

El kit de reactivos MiSeqDx v. 3 de Illumina es un conjunto de reactivos y consumibles de un solo uso que se utiliza para llevar a cabo un experimento de secuenciación de una o varias bibliotecas de muestras en el instrumento MiSeqDx. La cantidad de bibliotecas de muestras depende del multiplexado que admita el método ascendente de preparación de bibliotecas.

Consulte las siguientes tablas para ver una lista completa de los reactivos que se suministran en este kit.

Kit de reactivos MiSeqDx v. 3, caja 1

Tabla 1 Reactivos de posamplificación de la caja 1

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Tampón de dilución de biblioteca	1 tubo	4,5 ml	Solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Cartucho de reactivo MiSeqDx v. 3 (con etiqueta RFID)	Uno de cada	Varios	Cartucho cargado de un solo uso	Entre -25 °C y -15 °C

Kit de reactivos MiSeqDx v. 3, caja 2

Tabla 2 Reactivos de posamplificación de la caja 2

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Solución SBS de MiSeqDx (PR2) (con etiqueta RFID)	1 botella	500 ml	Solución acuosa tamponada	Entre 2 °C y 8 °C
Celda de flujo MiSeqDx (con etiqueta RFID)	Uno de cada	N/D	Celda de flujo de cristal "paired-end" de un solo uso en solución acuosa tamponada	Entre 2 °C y 8 °C

Almacenamiento y manipulación

- 1 La temperatura ambiente se define como la temperatura que oscila entre 15 °C y 30 °C.
- 2 Los siguientes reactivos se suministran congelados y permanecen estables cuando se almacenan a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C hasta la fecha de caducidad especificada.
 - ▶ Tampón de dilución de biblioteca
 - ▶ Cartucho de reactivo MiSeqDx v. 3

**NOTA**

El tampón de dilución de biblioteca y el cartucho de reactivo MiSeqDx v. 3 son de un solo uso y permanecen estables tras descongelarse a temperatura ambiente una única vez antes de la fecha indicada de caducidad. Una vez se ha descongelado el cartucho de reactivo, se debe cargar con la biblioteca de muestras y debe utilizarse inmediatamente en el instrumento MiSeqDx. En caso de no ser así, el cartucho de reactivo ya descongelado debe mantenerse a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C durante un máximo de seis horas, después deberá cargarse con la biblioteca de muestras y utilizarse inmediatamente en el instrumento MiSeqDx.

- 3 Los siguientes reactivos se suministran refrigerados y permanecen estables cuando se almacenan a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C hasta la fecha de caducidad especificada.
 - ▶ Solución SBS de MiSeqDx (PR2)
 - ▶ Celda de flujo MiSeqDx
 La solución SBS de MiSeqDx (PR2) y la celda de flujo de MiSeqDx son artículos de un solo uso.
- 4 Los cambios en el aspecto físico de los reactivos proporcionados pueden señalar el deterioro de los materiales. Si se producen cambios en el aspecto físico (tales como cambios evidentes en el color del reactivo o un aspecto turbio con contaminación microbiana), no utilice los reactivos.

Materiales y equipo necesarios que se venden por separado

- 1 **Instrumento MiSeqDx**, n.º de catálogo DX-410-1001

Advertencias y precauciones

**PRECAUCIÓN**

Las leyes federales limitan la venta de este dispositivo a médicos u otros facultativos, o bajo prescripción de estos, que se encuentren autorizados en virtud de la legislación del estado en el que ejercen su profesión para utilizar u ordenar la utilización de este dispositivo.

- 1 **Algunos componentes de este ensayo contienen productos químicos potencialmente peligrosos. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Utilice un equipo de protección, incluidos gafas, guantes y batas de laboratorio adecuados para el riesgo de exposición. Manipule los reactivos utilizados como residuos químicos y deséchelos de conformidad con las normativas y leyes regionales, nacionales y locales aplicables.** Para obtener más información sobre seguridad, salud y medioambiente, consulte la hoja de datos de seguridad en support.illumina.com/sds.html. (Consulte la sección *Reactivos en la página 3* para obtener más información).
- 2 El incumplimiento de los procedimientos descritos puede provocar resultados erróneos o una reducción considerable de la calidad de las muestras.
- 3 Utilice las precauciones rutinarias del laboratorio. No pipetee con la boca. No coma, beba ni fume en las zonas de trabajo designadas. Utilice guantes desechables y batas de laboratorio para la manipulación de muestras y reactivos del ensayo. Lávese bien las manos tras la manipulación de muestras y reactivos del ensayo.
- 4 Se precisan prácticas de laboratorio adecuadas y procedimientos óptimos en materia de higiene de laboratorio para evitar que los productos de PCR contaminen los reactivos, los instrumentos y las muestras de ADN genómico. La contaminación mediante PCR puede conllevar resultados poco precisos y fiables.
- 5 Para evitar la contaminación, asegúrese de que las áreas de preamplificación y posamplificación dispongan de equipos específicos (tales como pipetas, puntas de pipeta, mezclador vorticial y centrifugadora).
- 6 La asociación de las muestras con los índices debe coincidir de forma exacta con la disposición de la placa impresa. Local Run Manager se encarga de rellenar de forma automática los cebadores de índices que se han asociado con los nombres de las muestras cuando estos se introducen en el módulo. Compruebe los cebadores de índices que se han asignado a las muestras antes de comenzar el experimento de secuenciación. Las discrepancias entre la distribución de la placa que se ha imprimido y las muestras pueden tener como consecuencia que no se identifiquen las muestras positivas y que el informe de resultados sea erróneo.

Instrucciones de uso

Consulte el *prospecto del instrumento MiSeqDx* (n.º de documento 1000000021963).

Características de rendimiento

Consulte el *prospecto del instrumento MiSeqDx* (n.º de documento 1000000021963).

Patentes y marcas registradas

Este documento y su contenido son propiedad de Illumina, Inc. y sus afiliados ("Illumina") y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes en conexión con el uso de los productos descritos en él y no para ningún otro fin. Este documento y su contenido no se utilizarán ni distribuirán con ningún otro fin ni tampoco se comunicarán, divulgarán ni reproducirán en ninguna otra forma sin el consentimiento previo por escrito de Illumina. Illumina no transfiere mediante este documento ninguna licencia bajo sus derechos de patente, marca comercial, copyright ni derechos de autor o similares derechos de terceros.

Para asegurar el uso correcto y seguro de los productos descritos en este documento, el personal cualificado y adecuadamente capacitado debe seguir las instrucciones incluidas en este de manera rigurosa y expresa. Se debe leer y entender completamente todo el contenido de este documento antes de usar estos productos.

SI NO SE LEE COMPLETAMENTE EL DOCUMENTO Y NO SE SIGUEN EXPRESAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES DESCRITAS EN ESTE, PODRÍAN PRODUCIRSE DAÑOS EN EL PRODUCTO, LESIONES PERSONALES, INCLUIDOS LOS USUARIOS U OTRAS PERSONAS Y DAÑOS EN OTROS BIENES Y QUEDARÁ ANULADA TODA GARANTÍA APLICABLE AL PRODUCTO.

ILLUMINA NO ASUME RESPONSABILIDAD ALGUNA DERIVADA DEL USO INCORRECTO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS LAS PIEZAS O EL SOFTWARE).

© 2021 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Illumina, MiSeqDx y el diseño de las bases de streaming son marcas comerciales registradas o pendientes de Illumina, Inc. o sus afiliados en EE. UU. o en otros países. Todos los demás nombres, logotipos y marcas comerciales son propiedad de sus respectivos dueños.

Información de contacto



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 (EE. UU.)
+ 1 800 809 ILMN (4566)
+ 1 858 202 4566 (fuera de Norteamérica)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Patrocinador australiano

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

Etiquetado de productos

Para obtener una información detallada sobre los símbolos que aparecen en las etiquetas o en el embalaje del producto, consulte la leyenda que se ofrece en support.illumina.com en la ficha *Documentation and Literature* (Documentación y publicaciones) del kit.