

MiSeqDx Reagent Kit v3

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

N. di catalogo 20012552 o 20037124: 1 corsa

Uso previsto

MiSeqDx™ Reagent Kit v3 Illumina è un set di reagenti e materiali di consumo previsti per il sequenziamento di librerie di campioni quando utilizzato con saggi convalidati. MiSeqDx Reagent Kit v3 è previsto per l'uso con lo strumento MiSeqDx e software analitici.

Principi della procedura

Per MiSeqDx Reagent Kit v3 è necessario preparare librerie ottenute da DNA dove gli indici campioni e le sequenze catturate vengono aggiunti ai target. Le librerie di campioni sono catturate su una cella a flusso e sequenziate sullo strumento utilizzando la chimica di sequenziamento mediante sintesi (Sequencing By Synthesis, SBS). La chimica SBS utilizza un metodo che fa uso di terminatori reversibili per rilevare le singole basi nucleotidiche man mano che vengono incorporate in filamenti di DNA crescenti.

L'insero della confezione dello strumento MiSeqDx (documento n. 1000000021963) fornisce le istruzioni per la preparazione del sequenziamento sullo strumento MiSeqDx.

Limiti della procedura

- 1 Per uso diagnostico *in vitro*.
- 2 Le letture contengono inserzioni, delezioni o combinazioni delle due (Indel).
Il software del saggio non allinea il contenuto di lunghezza superiore a 25 bp. Di conseguenza, le Indel di lunghezza superiore a 25 bp non sono rilevabili dal software del saggio.
- 3 Il sistema è stato convalidato per il rilevamento di varianti di singolo nucleotide (Single Nucleotide Variant, SNV) e di delezioni fino a 25 bp e di inserzioni fino a 24 bp quando utilizzati con il software dei moduli Germline Variant e Somatic Variant. Per le identificazioni delle varianti somatiche, sono state rilevate delezioni di 25 bp e inserzioni di 18 bp a una frequenza della variante di 0,05.
- 4 Le letture degli ampliconi con contenuto estremo della variante potrebbero non essere allineate dal software del saggio, risultando in regioni riportate come wild-type. Tale contenuto estremo include:
 - ▶ Letture contenenti più di tre Indel.
 - ▶ Letture di lunghezza di almeno 30 bp con contenuto SNV superiore a 4% della lunghezza totale dell'amplicone target (escluse le regioni della sonda)
 - ▶ Letture di lunghezza inferiore a 30 bp con contenuto SNV superiore a 10% della lunghezza totale dell'amplicone (include le regioni della sonda)
- 5 Ampie varianti, incluse le varianti di più nucleotidi (Multi-Nucleotide Variant, MNV) e ampie Indel, potrebbero essere riportate come varianti più piccole nel file di output in formato VCF.
- 6 Le varianti della delezione potrebbero essere filtrate o non rilevate quando si trovano su due ampliconi rilevati sulle tile se la lunghezza della delezione è pari o maggiore alla sovrapposizione tra gli ampliconi rilevati sulle tile.
- 7 Il sistema non può rilevare le Indel, se si verificano direttamente accanto a un primer e dove non è presente un amplicone sovrapposto. Per le regioni con ampliconi sovrapposti, il saggio non può rilevare le delezioni quando la regione di sovrapposizione è inferiore alla dimensione della delezione da rilevare. Ad esempio, se la regione di sovrapposizione tra due ampliconi adiacenti è di due basi, il saggio non può rilevare alcuna delezione includendo entrambe quelle basi. Una delezione di una singola base a una qualsiasi di quelle basi può essere rilevata.

- 8 Come per qualsiasi flusso di lavoro di preparazione delle librerie basato su ibridazione, i polimorfismi, le mutazioni, le inserzioni o le delezioni latenti nelle regioni che legano gli oligonucleotidi possono incidere sugli alleli sondati e, di conseguenza, sulle identificazioni effettuate durante il sequenziamento. Ad esempio:
 - ▶ Una variante nella fase con una variante nella regione del primer potrebbe non essere amplificata fornendo un falso negativo.
 - ▶ Le varianti nella regione del primer potrebbero impedire l'amplificazione dell'allele di riferimento fornendo un'identificazione della variante omozigote errata.
 - ▶ Le varianti delle Indel nella regione del primer potrebbero fornire un'identificazione falso positiva al termine della lettura adiacente al primer.
- 9 Le Indel potrebbero essere filtrate a causa di distorsioni del filamento se si verificano accanto alla fine di una lettura e sono sottoposte a soft-clipping durante l'allineamento.
- 10 Non sono state convalidate piccole MNV e vengono solo riportate nel modulo Somatic Variant.
- 11 Nel file VCF vengono riportate le delezioni alla coordinata della base precedente per il formato VCF; quindi, prendere in considerazione le varianti adiacenti prima di riportare una singola identificazione delle basi come riferimento omozigote.
- 12 Limitazioni specifiche per il modulo Germline Variant:
 - ▶ Lo strumento MiSeqDx, utilizzando il modulo Local Run Manager Germline Variant, è progettato per fornire risultati qualitativi per l'identificazione di varianti della linea germinale (ad es., omozigoti, eterozigoti, wild type).
 - ▶ Quando utilizzato con il modulo Germline Variant, la copertura minima per l'amplicone necessaria per l'accurata identificazione delle varianti è di 150x. Di conseguenza, sono richiesti frammenti di DNA in grado di supportare una copertura di 150; questo valore equivale a 300 letture paired-end sovrapposte. Il numero di campioni e il numero totale di basi target incidono sulla copertura. Il contenuto in GC e altro contenuto genomico possono incidere sulla copertura.
 - ▶ La variazione del numero di copie può incidere sulla possibilità che una variante venga identificata come omozigote o eterozigote.
 - ▶ Le varianti in un determinato contesto ripetitivo sono filtrate nei file VCF. Il filtro RMxN per le ripetizioni viene utilizzato per filtrare le varianti se tutta o parte della sequenza della variante è presente ripetitivamente nel genoma di riferimento adiacente alla posizione della variante. Per l'identificazione delle varianti della linea germinale, sono richieste almeno nove ripetizioni nel riferimento affinché una variante venga filtrata e vengono prese in considerazione solo le ripetizioni con una lunghezza fino a 5 bp (R5x9).
- 13 Limitazioni specifiche per il modulo Somatic:
 - ▶ Lo strumento MiSeqDx, utilizzando il modulo Local Run Manager Somatic Variant, è progettato per offrire risultati qualitativi per l'identificazione di varianti somatiche (ad es., presenza di una variante somatica con una frequenza della variante di $\geq 0,026$ con un limite di rilevamento di 0,05).
 - ▶ Quando utilizzato con il modulo Somatic Variant, la copertura minima per l'amplicone necessaria per l'accurata identificazione delle varianti è di 450x per il raggruppamento in pool degli oligonucleotidi. Di conseguenza, per il raggruppamento in pool di oligonucleotidi sono richiesti frammenti di DNA in grado di supportare una copertura di 450; questo valore equivale a 900 letture paired-end sovrapposte. Il numero di campioni e il numero totale di basi target incidono sulla copertura. Il contenuto in GC e altro contenuto genomico possono incidere sulla copertura.
 - ▶ Per l'identificazione delle varianti somatiche, sono richieste almeno sei ripetizioni nel riferimento affinché una variante venga filtrata e vengono prese in considerazione solo le ripetizioni con una lunghezza fino a 3 bp (R3x6).
 - ▶ Il modulo Somatic Variant non è grado di differenziare tra le varianti della linea germinale e le varianti somatiche. Il modulo è progettato per rilevare le varianti su un intervallo di frequenze delle varianti, ma la frequenza della variante non può essere utilizzata per differenziare le varianti somatiche dalle varianti della linea germinale.
 - ▶ I tessuti normali contenuti nel campione incidono sul rilevamento delle varianti. Il limite di rilevamento riportato si basa su una frequenza della variante relativa al DNA totale estratto sia da tessuto di tumore che da tessuto normale.

Componenti del prodotto

MiSeqDx Reagent Kit v3 Illumina è composto da:

- ▶ Tampone di diluizione della libreria, cella a flusso e reagenti post-amplificazione

Reagenti

Reagenti forniti

MiSeqDx Reagent Kit v3 Illumina è un set di reagenti e materiali di consumo monouso per il sequenziamento di una corsa composta da una o più librerie di campioni sullo strumento MiSeqDx. Il numero di librerie di campioni dipende dal multiplex supportato dal metodo di preparazione delle librerie a monte.

Vedere le seguenti tabelle per un elenco completo dei reagenti forniti in questo kit.

MiSeqDx Reagent Kit v3, scatola 1

Tabella 1 Reagenti post-amplificazione, scatola 1

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Tampone di diluizione della libreria	1 provetta	4,5 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra -25 °C e -15 °C
Cartuccia MiSeqDx Reagent v3 (etichettata RFID)	1 ciascuna	Diversi	Cartuccia monouso preriempita	tra -25 °C e -15 °C

MiSeqDx Reagent Kit v3, scatola 2

Tabella 2 Reagenti post-amplificazione, scatola 2

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
MiSeqDx SBS Solution (PR2) (etichettato RFID)	1 flacone	500 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 2 °C e 8 °C
Cella a flusso MiSeqDx (etichettata RFID)	1 ciascuna	N/A	Cella a flusso in vetro, paired-end, monouso in soluzione acquosa tamponata	tra 2 °C e 8 °C

Conservazione e manipolazione

- 1 Per temperatura ambiente si intende la temperatura compresa tra 15 °C e 30 °C.
- 2 I reagenti elencati di seguito sono spediti congelati e rimangono stabili se conservati a una temperatura tra -25 °C e -15 °C fino alla data di scadenza specificata.
 - ▶ Tampone di diluizione della libreria
 - ▶ Cartuccia MiSeqDx Reagent v3



NOTA

Il tampone di diluizione della libreria e la cartuccia MiSeqDx Reagent v3 sono esclusivamente monouso e sono stabili solo per uno scongelamento a temperatura ambiente prima della data di scadenza indicata. Una volta scongelata, la cartuccia di reagenti deve essere caricata con la libreria dei campioni e immediatamente analizzata sullo strumento MiSeqDx. In alternativa, la cartuccia di reagenti scongelata può essere tenuta per un massimo di sei ore a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C, quindi caricata con la libreria dei campioni e immediatamente analizzata sullo strumento MiSeqDx.

- 3 I reagenti elencati di seguito sono spediti refrigerati e rimangono stabili se conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C fino alla data di scadenza indicata.
 - ▶ MiSeqDx SBS Solution (PR2)
 - ▶ Cella a flusso MiSeqDx
 MiSeqDx SBS Solution (PR2) e la cella a flusso MiSeqDx sono esclusivamente monouso.
- 4 Cambiamenti nell'aspetto fisico dei reagenti possono indicare un deterioramento dei materiali. Non utilizzare i reagenti in caso di cambiamenti nell'aspetto fisico (ad es., variazioni evidenti nel colore del reagente oppure opacità visibile con contaminazione microbica).

Apparecchiatura e materiali richiesti, venduti separatamente

- 1 **Strumento MiSeqDx**, n. di catalogo DX-410-1001

Avvertenze e precauzioni



ATTENZIONE

La legge federale limita la vendita di questo dispositivo da parte o dietro prescrizione di un medico o di un medico autorizzato dalla legge dello stato in cui esercita, ad usare o ad ordinare l'uso del dispositivo.

- 1 **Alcuni componenti del saggio contengono composti chimici potenzialmente pericolosi. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare l'attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumento da laboratorio appropriato per evitare i rischi di esposizione. Manipolare i reagenti utilizzati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni applicabili a livello regionale, nazionale e locale.** Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS alla pagina Web support.illumina.com/sds.html. Per maggiori informazioni, vedere *Reagenti a pagina 3*.
- 2 Il mancato rispetto delle procedure descritte può produrre risultati errati o una riduzione significativa della qualità del campione.
- 3 Adottare le normali precauzioni di laboratorio. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere o fumare nelle aree designate per il lavoro. Manipolare i campioni e i reagenti del saggio indossando guanti e indumenti da laboratorio monouso. Dopo aver maneggiato i campioni e i reagenti del saggio lavarsi bene le mani.
- 4 È necessario adottare pratiche di laboratorio e igiene di laboratorio idonee per impedire la contaminazione di reagenti, strumenti e campioni di DNA genomico con i prodotti della PCR. La contaminazione da PCR può produrre risultati inesatti e inaffidabili.
- 5 Al fine di prevenire la contaminazione, accertarsi che le zone di pre-amplificazione e di post-amplificazione siano dotate di apparecchiatura dedicata (ad es., pipette, punte di pipette, agitatori e centrifughe).
- 6 L'accoppiamento indice-campione deve corrispondere esattamente al layout stampato della piastra. Local Run Manager popola automaticamente gli index primer associati con i nomi dei campioni, quando immessi nel modulo. Prima dell'avvio della corsa di sequenziamento, verificare gli index primer associati con i campioni. Le mancate corrispondenze tra il layout stampato della piastra e il campione comporteranno la perdita di identificazioni positive del campione e report dei risultati errato.

Istruzioni per l'uso

Vedere *l'Insero della confezione per lo strumento MiSeqDx (documento n. 1000000021963)*.

Caratteristiche delle prestazioni

Vedere *l'Insero della confezione per lo strumento MiSeqDx (documento n. 1000000021963)*.

Brevetti e marchi di fabbrica

Questo documento e il suo contenuto sono di proprietà di Illumina, Inc. e delle aziende ad essa affiliate ("Illumina") e sono destinati esclusivamente ad uso contrattuale da parte dei clienti di Illumina, per quanto concerne l'utilizzo dei prodotti qui descritti, con esclusione di qualsiasi altro scopo. Questo documento e il suo contenuto non possono essere usati o distribuiti per altri scopi e/o in altro modo diffusi, resi pubblici o riprodotti, senza previa approvazione scritta da parte di Illumina. Mediante questo documento, Illumina non trasferisce a terzi alcuna licenza ai sensi dei suoi brevetti, marchi, copyright, o diritti riconosciuti dal diritto consuetudinario, né diritti simili di alcun genere.

Al fine di assicurare un uso sicuro e corretto dei prodotti qui descritti, le istruzioni riportate in questo documento devono essere scrupolosamente ed esplicitamente seguite da personale qualificato e adeguatamente formato. Leggere e comprendere a fondo tutto il contenuto di questo documento prima di usare tali prodotti.

LA LETTURA INCOMPLETA DEL CONTENUTO DEL PRESENTE DOCUMENTO E IL MANCATO RISPETTO DI TUTTE LE ISTRUZIONI IVI CONTENUTE POSSONO CAUSARE DANNI AL/I PRODOTTO/I, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI E RENDERANNO NULLA QUALSIASI GARANZIA APPLICABILE AL/I PRODOTTO/I.

ILLUMINA NON SI ASSUME ALCUNA RESPONSABILITÀ DERIVANTE DALL'USO IMPROPRIO DEL/DEI PRODOTTO/I QUI DESCRITTI (INCLUSI SOFTWARE O PARTI DI ESSO).

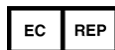
© 2021 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

Illumina, MiSeqDx e la grafica del fluire delle basi sono marchi di fabbrica registrati o in attesa di brevetto di Illumina, Inc. e/o delle sue affiliate negli Stati Uniti e/o in altri paesi. Tutti gli altri nomi, loghi e altri marchi di fabbrica sono di proprietà dei rispettivi titolari.

Informazioni di contatto



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Paesi Bassi

Sponsor Australiano

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

Etichettatura del prodotto

Per un riferimento completo dei simboli che si trovano sulla confezione del prodotto e sull'etichettatura, fare riferimento alla legenda dei simboli alla pagina [Web support.illumina.com](http://Web.support.illumina.com) sulla scheda *Documentation and Literature* (Documentazione e letteratura) per il kit in uso.