

MiSeq™ Dx Reagent Kit v3

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

Uso previsto

MiSeqDx Reagent Kit v3 Illumina è un set di reagenti e materiali di consumo destinati al sequenziamento di librerie di campioni da utilizzare con saggi convalidati. MiSeqDx Reagent Kit v3 è previsto per l'uso con lo strumento MiSeqDx e software analitici.

Principi della procedura

Come input, MiSeqDx Reagent Kit v3 utilizza librerie preparate 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 (SBS, Sequencing By Synthesis). La chimica SBS utilizza un metodo che fa uso di terminatori reversibili per rilevare le singole basi nucleotidiche marcate con colorante fluorescente man mano che vengono incorporate in filamenti di DNA in estensione.

Per istruzioni su come eseguire il sequenziamento sullo strumento MiSeqDx, vedere l'Insero della confezione dello strumento MiSeqDx specifico per la regione e la versione del software dello strumento.

Limiti della procedura

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Le limitazioni descritte in questo inserto della confezione si basano su saggi rappresentativi e moduli software, inclusi i moduli Germline Variant e Somatic Variant di Local Run Manager, sviluppati per la valutazione delle prestazioni con saggi rappresentativi.
- 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 coppie di basi con lunghezza superiore a 25 bp non sono rilevabili dal software del saggio.
- Il sistema è stato convalidato per il rilevamento di varianti di singolo nucleotide (SNV, Single Nucleotide Variant), di delezioni fino a 25 bp e di inserzioni fino a 24 bp quando utilizzato 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.

- Il software del saggio potrebbe non allineare le letture degli ampliconi con contenuto estremo della variante, 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 al 4% della lunghezza totale dell'amplicone target (escluse le regioni della sonda).
 - Letture di lunghezza inferiore a 30 bp con contenuto SNV superiore al 10% della lunghezza totale dell'amplicone (incluse le regioni della sonda).
- Le varianti ampie, incluse le varianti di più nucleotidi (MNV, Multi-Nucleotide Variant) e ampie indel, potrebbero essere riportate nel file di output VCF come varianti separate più piccole.
- Le varianti delle delezioni possono essere filtrate o non individuate quando si estendono su due ampliconi rilevati sulle tile se la lunghezza della delezione è maggiore o uguale alla sovrapposizione tra gli ampliconi rilevati sulle tile.
- 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. Può essere rilevata una delezione di una singola base a una qualsiasi di quelle basi.
- 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 e fornire un falso negativo.
 - Le varianti nella regione del primer potrebbero impedire l'amplificazione dell'allele di riferimento e fornire 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.
- Le indel possono 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.
- Non sono state convalidate piccole MNV e vengono solo riportate nel modulo Somatic Variant.
- Le delezioni sono riportate nel file VCF alla coordinata della base precedente in base al formato VCF. Pertanto, prendere in considerazione le varianti adiacenti prima di riportare una singola identificazione delle basi come un riferimento omozigote.

- Limitazioni specifiche per il modulo Germline Variant:
 - Lo strumento MiSeqDx, utilizzando il modulo Germline Variant di Local Run Manager, 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).
- Limitazioni specifiche per il modulo Somatic Variant:
 - Lo strumento MiSeqDx, utilizzando il modulo Somatic Variant di Local Run Manager, 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 pool di oligonucleotidi. Di conseguenza, per il 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 in grado di differenziare tra le varianti delle linee germinali 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 del 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, n. di catalogo 20037124, è composto da:

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

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 tabelle seguenti 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
Library Dilution Buffer	1 provetta	4,5 ml	Soluzione acquosa tamponata	Tra -25 °C e -15 °C
MiSeqDx Reagent v3 Cartridge (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) (etichettata RFID)	1 flacone	500 ml	Soluzione acquosa tamponata	Tra 2 °C e 8 °C
MiSeqDx Flow Cell (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

- Per temperatura ambiente si intende la temperatura compresa tra 15 °C e 30 °C.
- 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.
 - Library Dilution Buffer
 - MiSeqDx Reagent v3 Cartridge

NOTA: Library Dilution Buffer e MiSeqDx Reagent v3 Cartridge 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.

- 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)
 - MiSeqDx Flow CellMiSeqDx SBS Solution (PR2) e MiSeqDx Flow Cell sono esclusivamente monouso.
- 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).

Apparecchiature e materiali di consumo richiesti, venduti separatamente

- **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.



AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene materiali 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 usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni applicabili a livello regionale, nazionale e locale. Per ulteriori informazioni sulle considerazioni ambientali, sulla sicurezza e sulla salute, vedere le schede di sicurezza (SDS, Safety Data Sheet) alla pagina Web support.illumina.com/sds.html.

Per maggiori informazioni, vedere Reagenti a pagina 1.

- Il mancato rispetto delle procedure descritte può produrre risultati errati o una riduzione significativa della qualità del campione.
- 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.
- 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.
- Al fine di prevenire la contaminazione, accertarsi che le aree di pre-amplificazione e di post-amplificazione siano dotate di apparecchiatura dedicata (ad es., pipette, punte per pipette, agitatori e centrifughe).
- 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 vengono 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 errati.
- Riferire immediatamente qualsiasi incidente serio relativo a questo prodotto a Illumina e alle autorità competenti degli stati membri nei quali l'utente e il paziente sono residenti.

Istruzioni per l'uso

Vedere l'Insero della confezione dello strumento MiSeqDx specifico per la regione e la versione del software dello strumento.

Caratteristiche delle prestazioni

Vedere l'Insero della confezione dello strumento MiSeqDx specifico per la regione e la versione del software dello strumento.

Cronologia revisioni

Documento n.	Data	Descrizione della modifica
Documento n. 1000000030849 v04	Novembre 2021	Aggiornati i riferimenti all'Insero della confezione dello strumento MiSeqDx. Aggiornati Limiti della procedura e Avvertenze e precauzioni con ulteriori chiarimenti. Piccoli aggiornamenti per allineare il documento con lo stile e gli standard della documentazione Illumina.
Documento n. 1000000030849 v03	Agosto 2021	Aggiornati gli indirizzi dei rappresentanti autorizzati nell'Unione Europea. Aggiunta la tabella Cronologia revisioni.

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.

Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, consultare la pagina Web www.illumina.com/company/legal.html.

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 per il kit in uso alla pagina Web support.illumina.com.