

Zestaw odczynników MiSeq™ Dx Reagent Kit v3

DO STOSOWANIA W DIAGNOSTYCE IN VITRO

Przeznaczenie

Zestaw Illumina MiSeqDx Reagent Kit v3 to zestaw odczynników i materiałów eksploatacyjnych przeznaczonych do sekwencjonowania bibliotek próbek podczas stosowania ze zwalidowanymi oznaczeniami. Zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 jest przeznaczony do stosowania w połączeniu z aparatem MiSeqDx i oprogramowaniem analitycznym.

Zasady dotyczące procedury

Funkcję danych wejściowych w przypadku zestawu odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 stanowią biblioteki przygotowane z DNA, w których do sekwencji docelowych dodawane są indeksy próbek i sekwencje przechwytywania. Biblioteki próbek są przechwytywane w komorze przepływowej i sekwencjonowane w aparacie przy użyciu technologii sekwencjonowania przez syntezę (SBS, Sequencing By Synthesis). W technologii SBS stosowana jest metoda terminatora odwracalnego, służąca do wykrywania fluorescencyjnie znakowanych pojedynczych nukleotydów w miarę ich wiązania w rosnących łańcuchach DNA.

Instrukcje wykonywania sekwencjonowania za pomocą aparatu MiSeqDx należy sprawdzić w ulotce dołączonej do opakowania aparatu MiSeqDx w danym kraju odpowiedniej dla danej wersji oprogramowania aparatu.

Ograniczenia dotyczące procedury

- Do celów diagnostyki *in vitro*.
- Ograniczenia opisane w niniejszej ulotce dołączonej do opakowania ustalono na podstawie oznaczeń reprezentatywnych i modułów oprogramowania, w tym modułu analizy wariantów linii zarodkowej lokalnego menedżera przebiegu oraz modułu analizy wariantów somatycznych, które opracowano do oceny skuteczności oznaczeń reprezentatywnych.
- Odczyty zawierające insercje, delecje lub ich kombinacje (polimorfizmy typu indel).

Zawartość o długości > 25 bp nie jest dopasowywana przez oprogramowanie do oznaczeń. W rezultacie oprogramowanie do oznaczeń nie wykrywa polimorfizmów typu indel o długości > 25 par nukleotydów (ang. base pair, bp).

- System został zwalidowany do wykrywania wariantów pojedynczych nukleotydów (SNV, Single Nucleotide Variant) i delecji o długości do 25 bp oraz insercji o długości 24 bp w przypadku stosowania z oprogramowaniem do wykrywania wariantów linii zarodkowej lub wariantów somatycznych. W przypadku rozpoznawania wariantów somatycznych przy częstości wariantów wynoszącej 0,05 wykryto delecje o długości 25 bp oraz insercje o długości 18 bp.
- Oprogramowanie do oznaczeń może nie dopasowywać odczytów ampikonów z ekstremalną zawartością wariantów, co prowadzi do zgłoszenia regionu jako typu dzikiego. Taka ekstremalna zawartość obejmuje:
 - Odczyty zawierające ponad trzy polimorfizmy typu indel
 - Odczyty o długości co najmniej 30 bp z zawartością SNV > 4% całkowitej długości docelowej ampikonu (z wykluczeniem regionów sondy)
 - Odczyty o długości < 30 bp o zawartości SNV > 10% całkowitej długości ampikonu (z uwzględnieniem regionów sondy)
- Duże warianty, w tym warianty wielonukleotydowe (MNV, Multi-Nucleotide Variant) i duże polimorfizmy typu indel, mogą zostać zgłoszone jako odrębne mniejsze warianty w wyjściowym pliku VCF.
- Warianty delecji mogą być filtrowane lub pominięte w przypadku rozciągnięcia na dwa sąsiednie ampikony, jeśli długość delecji jest większa lub równa nałożeniu pomiędzy sąsiednimi ampikonami.
- System nie jest w stanie wykryć polimorfizmów typu indel, jeśli występują bezpośrednio obok startera i nie ma nakładającego się ampikonu. W przypadku regionów z nakładającymi się ampikonami oznaczenie nie pozwala wykryć delecji, kiedy region nałożenia jest mniejszy niż rozmiar wykrywanej delecji. Na przykład: jeśli region nałożenia pomiędzy dwoma sąsiednimi ampikonami obejmuje dwa nukleotydy, oznaczenie nie pozwala wykryć żadnych delecji obejmujących oba te nukleotydy. Delecja pojedynczego nukleotydu na dowolnym z tych nukleotydów może zostać wykryta.
- Podobnie jak w przypadku procedur przygotowania bibliotek opartych na hybrydyzacji, odpowiednie polimorfizmy, mutacje, insercje lub delecje w regionach wiązań oligonukleotydów mogą mieć wpływ na badane allele, a w związku z tym na rozpoznania nukleotydów podczas sekwencjonowania. Na przykład:
 - Wariant w fazie z wariantem w regionie startera może nie ulec amplifikacji, dając wynik fałszywie ujemny.
 - Warianty w regionie startera mogą uniemożliwić amplifikację allelu referencyjnego, prowadząc do nieprawidłowego wykrycia wariantu homozygotycznego.
 - Warianty typu indel w regionie startera mogą doprowadzić do fałszywie dodatniego rozpoznania pod koniec odczytu w sąsiedztwie startera.

- Polimorfizmy typu indel można filtrować na podstawie obciążenia systematycznego nici, jeśli występują w pobliżu końca odczytu i są poddawane procesowi soft-clippingu podczas dopasowania.
- Małe warianty MNV mogą nie zostać zwalidowane i są zgłaszane wyłącznie w module wykrywania wariantów somatycznych.
- Delecje są zgłaszane w pliku VCF we współrzędnej poprzedniego nukleotydu według formatu VCF. W związku z tym należy uwzględnić sąsiednie warianty przed zgłoszeniem, że rozpoznanie danego nukleotydu jest odniesieniem homozygotycznym.
- Ograniczenia specyficzne dla linii zarodkowej:
 - Aparat MiSeqDx wykorzystujący moduł analizy wariantów linii zarodkowej lokalnego menedżera przebiegu jest przeznaczony do generowania jakościowych wyników rozpoznawania wariantów linii zarodkowej (np. homozygotycznych, heterozygotycznych, typu dzikiego).
 - W przypadku stosowania z modułem do wykrywania wariantów linii zarodkowej minimalne pokrycie na amplicon niezbędne do dokładnego rozpoznania wariantu wynosi 150x. W konsekwencji wymaganych jest 150 potwierdzających fragmentów DNA, co odpowiada 300 nakładającym się odczytom w trybie sparowanych końców. Liczba próbek i łączna liczba celowanych nukleotydów wpływają na pokrycie. Zawartość GC i inna zawartość genomowa mogą wpływać na pokrycie.
 - Zmienność liczby kopii może wpływać na to, czy wariant zostanie rozpoznany jako homo- czy heterozygotyczny.
 - Warianty w pewnym powtarzalnym kontekście są wyfiltrowywane w plikach VCF. Filtr powtórzeń RMxN jest stosowany do filtrowania wariantów, jeśli całość lub część sekwencji wariantu występuje powtarzalnie w genomie referencyjnym sąsiadującym z pozycją wariantu. W przypadku rozpoznawania wariantów linii zarodkowej potrzeba co najmniej dziewięciu powtórzeń w regionie referencyjnym do wyfiltrowania wariantu, przy czym uwzględniane są tylko powtórzenia o długości do 5 bp (R5x9).
- Ograniczenia swoiste dla wariantów somatycznych:
 - Aparat MiSeqDx wykorzystujący moduł lokalnego menedżera przebiegu do wykrywania wariantów somatycznych jest przeznaczony do generowania jakościowych wyników rozpoznawania wariantów somatycznych (np. obecność wariantu somatycznego o częstości występowania wariantu $\geq 0,026$ przy granicy wykrywalności wynoszącej 0,05).
 - W przypadku stosowania z modułem do wykrywania wariantów linii somatycznej minimalne pokrycie na amplicon niezbędne do dokładnego rozpoznania wariantu wynosi 450x na pulę oligonukleotydów. W konsekwencji wymaganych jest 450 potwierdzających fragmentów DNA na pulę oligonukleotydów, co odpowiada 900 nakładającym się odczytom w trybie sparowanych końców. Liczba próbek i łączna liczba celowanych nukleotydów wpływają na pokrycie. Zawartość GC i inna zawartość genomowa mogą wpływać na pokrycie.

- W przypadku rozpoznawania wariantów linii somatycznej potrzeba co najmniej sześciu powtórzeń w regionie referencyjnym do wyfiltrowania wariantu, przy czym uwzględniane są tylko powtórzenia o długości do 3 bp (R3x6).
- Moduł do wykrywania wariantów somatycznych nie jest w stanie odróżnić wariantów linii zarodkowej od wariantów somatycznych. Moduł jest przeznaczony do wykrywania wariantów o różnych częstościach wariantu, jednak częstości wariantu nie można użyć do odróżnienia wariantów somatycznych od wariantów linii zarodkowej.
- Obecność prawidłowej tkanki w próbce wpływa na wykrywanie wariantów. Zgłoszona granica wykrywalności jest oparta na częstości wariantu względem całkowitego DNA wyekstrahowanego z tkanki nowotworowej i prawidłowej.

Elementy produktu

Zestaw odczynników Illumina MiSeqDx Reagent Kit v3 (nr kat. 20037124) zawiera następujące elementy:

- Bufor do rozcieńczania bibliotek, komora przepływowa i odczynniki poamplifikacyjne

Odczynniki dostarczane

Zestaw odczynników Illumina MiSeqDx Reagent Kit v3 to jednorazowy zestaw odczynników i materiałów eksploatacyjnych do sekwencjonowania jednego przebiegu co najmniej jednej biblioteki próbek w aparacie MiSeqDx. Liczba bibliotek próbek jest zależna od multipleksowania będącego składową wcześniejszej metody przygotowania biblioteki.

Pełną listę odczynników dostarczonych w zestawie zawierają poniższe tabele.

Zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3, opakowanie 1

Tabela 1 Odczynniki po amplifikacji, opakowanie 1

Element	Ilość	Objętość wypełnienia	Składniki aktywne	Przechowywanie
Bufor do rozcieńczeń biblioteki	1 probówka	4,5 ml	Buforowany roztwór wodny	od -25°C do -15°C

Element	Ilość	Objętość wypełnienia	Składniki aktywne	Przechowywanie
Kaseta odczynników MiSeqDx Reagent Cartridge v3 (oznaczona RFID)	1 szt.	Różne	Jednorazowa, fabrycznie napełniona kasetka	od -25°C do -15°C

Zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3, opakowanie 2

Tabela 2 Odczynniki po amplifikacji, opakowanie 2

Element	Ilość	Objętość wypełnienia	Składniki aktywne	Przechowywanie
Roztwór MiSeqDx SBS Solution (PR2) (oznaczony RFID)	1 butelka	500 ml	Buforowany roztwór wodny	Od 2°C do 8°C
Komora przepływowa MiSeqDx (oznaczona RFID)	1 szt.	Nd.	Jednorazowa, szklana komora przepływowa w buforowanym roztworze wodnym, do sekwencjonowania w trybie sparowanych końców	Od 2°C do 8°C

Przechowywanie i sposób postępowania

- Temperaturę pokojową zdefiniowano jako 15°C do 30°C.
- Następujące odczynniki są dostarczane w stanie zamrożonym i pozostają stabilne w temperaturze od -25°C do -15°C do podanego terminu ważności.
 - Bufor do rozcieńczeń biblioteki
 - Kaseta odczynników MiSeqDx Reagent Cartridge v3

UWAGA: Bufor do rozcieńczania bibliotek i kasety odczynników MiSeqDx Reagent Cartridge v3 są przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku i zachowują stabilność przez maksymalnie jedno rozmrożenie do temperatury pokojowej przed podanym terminem ważności. Po rozmrożeniu kasety z odczynnikami musi zostać załadowana biblioteką próbek i natychmiast poddana analizie w aparacie MiSeqDx. Ewentualnie rozmrożona kasety z odczynnikami może być przechowywana w temperaturze od 2°C do 8°C nie dłużej niż 6 godzin, a następnie musi zostać załadowana biblioteką próbek i natychmiast poddana analizie w aparacie MiSeqDx.

- Następujące odczynniki są dostarczane schłodzone i pozostają stabilne w temperaturze od 2°C do 8°C do podanego terminu ważności.
 - Roztwór MiSeqDx SBS Solution (PR2)
 - Komora przepływowa aparatu MiSeqDxRoztwór MiSeqDx SBS Solution (PR2) i komora przepływowa MiSeqDx Flow Cell są przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku.
- Zmiany w fizycznym wyglądzie odczynników mogą wskazywać na pogorszenie się stanu materiałów. Jeśli wystąpią zmiany w wyglądzie fizycznym (np. oczywiste zmiany koloru odczynnika lub zmętnienie będące oczywistym wynikiem skażenia mikrobiologicznego), nie należy używać odczynników.

Wymagane wyposażenie i materiały, sprzedawane osobno

- **Aparat MiSeqDx**, nr katalogowy DX-410-1001

Ostrzeżenia i środki ostrożności



PRZESTROGA

Prawo federalne dopuszcza sprzedaż tego urządzenia do użytku lub zlecenia użytku wyłącznie przez lekarza lub na jego zlecenie, bądź innego specjalistę posiadającego ważną licencję stanu, w którym prowadzi praktykę.



OSTRZEŻENIE

Ten zestaw odczynników zawiera potencjalnie niebezpieczne substancje chemiczne. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Należy nosić wyposażenie ochronne, w tym ochronę oczu, rękawiczki oraz fartuch laboratoryjny odpowiednie do ryzyka narażenia. Zużyte odczynniki należy traktować jako odpady chemiczne i utylizować je zgodnie z odpowiednimi przepisami regionalnymi, krajowymi i lokalnymi. Dodatkowe informacje dotyczące ochrony środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa zawiera karta charakterystyki (SDS) dostępna na stronie support.illumina.com/sds.html.

(Więcej informacji zawiera sekcja Odczynniki na stronie 1).

- Nieprzestrzeganie przedstawionych procedur może powodować błędy w wynikach lub znaczne obniżenie jakości próbek.
- Należy przestrzegać środków ostrożności dotyczących rutynowych badań laboratoryjnych. Nie należy pipetować ustami. Nie należy jeść, pić ani palić tytoniu w wyznaczonych obszarach roboczych. Podczas posługiwania się próbkami i odczynnikami testowymi należy nosić jednorazowe rękawice i fartuchy laboratoryjne. Po zakończeniu posługiwania się próbkami i odczynnikami testowymi należy dokładnie umyć ręce.
- Przestrzeganie zasad wykonywania prac oraz higieny prac laboratoryjnych jest wymagane, aby chronić produkty reakcji PCR przed zanieczyszczeniem przez odczynniki, przyrządy lub próbki genomowego DNA. Zanieczyszczenie produktów reakcji PCR może powodować niedokładne i niepewne wyniki.
- Aby zapobiegać zanieczyszczeniu produktów, należy upewnić się, że obszary procesu przed amplifikacją i po niej zostały wyposażone w odrębne przyrządy (np. pipety, końcówki do pipetowania, mieszadło wirowe i wirówkę).
- Parowanie indeksów i próbek powinno przebiegać w ścisłej zgodności z układem wydrukowanej płytki. Lokalny menedżer przebiegu automatycznie podstawia startery indeksowe związane z nazwami próbek, jeśli zostały wprowadzone do modułu. Przed rozpoczęciem przebiegu sekwencjonowania należy zweryfikować powiązania starterów indeksowych z próbkami. Niezgodności między układem wydrukowanej płytki a próbką spowodują utratę rozpoznania próbki dodatkowo i nieprawidłowe dane w raporcie wyników.
- Wszelkie poważne incydenty związane z tym produktem należy niezwłocznie zgłaszać do firmy Illumina i właściwego organu państwa członkowskiego, w którym przebywa użytkownik i/lub pacjent.

Instrukcja użytkowania

Należy sprawdzić w ulotce dołączonej do opakowania aparatu MiSeqDx w danym kraju odpowiedniej dla danej wersji oprogramowania aparatu.

Charakterystyka działania

Należy sprawdzić w ulotce dołączonej do opakowania aparatu MiSeqDx w danym kraju odpowiedniej dla danej wersji oprogramowania aparatu.

Historia wersji

Nr dokumentu	Data	Opis zmiany
Nr dokumentu 1000000030849 wer. 04	Listopad 2021 r.	Zaktualizowano część „Piśmiennictwo” w Ulotce dołączonej do opakowania aparatu MiSeqDx. Uzupełniono części „Ograniczenia dotyczące procedury” oraz „Ostrzeżenia i środki ostrożności” o dodatkowe wyjaśnienia. Drobne poprawki mające na celu ujednoczenie dokumentacji firmy Illumina pod kątem stylu i norm.
Nr dokumentu 1000000030849 wer. 03	Sierpień 2021 r.	Zaktualizowano adres autoryzowanego przedstawiciela w UE. Dodano tabelę z historią wersji.

Patenty i znaki towarowe

Niniejszy dokument oraz jego treść stanowią własność firmy Illumina, Inc. oraz jej podmiotów zależnych („Illumina”) i są przeznaczone wyłącznie do użytku zgodnego z umową przez klienta firmy w związku z użytkowaniem produktów opisanych w niniejszym dokumencie, z wyłączeniem innych celów. Niniejszy dokument oraz jego treść nie będą wykorzystywane ani rozpowszechniane do innych celów i/lub publikowane w inny sposób, ujawniane ani kopiowane bez pisemnej zgody firmy Illumina. Firma Illumina na podstawie niniejszego dokumentu nie przenosi żadnych licencji podlegających przepisom w zakresie patentów, znaków towarowych czy praw autorskich ani prawu powszechnemu lub prawom pokrewnym osób trzecich.

W celu zapewnienia właściwego i bezpiecznego użytkowania produktów opisanych w niniejszym dokumencie podane instrukcje powinny być ściśle przestrzegane przez wykwalifikowany i właściwie przeszkolony personel. Przed rozpoczęciem użytkowania tych produktów należy zapoznać się z całą treścią niniejszego dokumentu.

NIEZAPOZNANIE SIĘ LUB NIEDOKŁADNE PRZESTRZEGANIE WSZYSTKICH INSTRUKCJI PODANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE MOŻE SPOWODOWAĆ USZKODZENIE PRODUKTÓW LUB OBRAŻENIA CIAŁA UŻYTKOWNIKÓW LUB INNYCH OSÓB ORAZ USZKODZENIE INNEGO MIENIA, A TAKŻE SPOWODUJE UNIEWAŻNIENIE WSZELKICH GWARANCJI DOTYCZĄCYCH PRODUKTÓW.

FIRMA ILLUMINA NIE PONOSI ODPOWIEDZIALNOŚCI ZA NIEWŁAŚCIWE UŻYTKOWANIE PRODUKTÓW (W TYM ICH CZĘŚCI I OPROGRAMOWANIA) OPISANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE.

© 2021 Illumina, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Wszystkie znaki towarowe są własnością firmy Illumina, Inc. lub ich odpowiednich właścicieli. Szczegółowe informacje na temat znaków towarowych można znaleźć na stronie www.illumina.com/company/legal.html.

Informacje kontaktowe



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122, USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (poza Ameryką Północną)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B. V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Holandia

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

Etykiety produktu

Objaśnienia symboli zamieszczonych na opakowaniu i samym produkcie znajdują się w kluczu symboli użytych w danym zestawie, dostępnym na stronie support.illumina.com.