

NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cicli)

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

N. di catalogo 20028871

Uso previsto

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cicli) Illumina è un set di reagenti e materiali di consumo destinati al sequenziamento di librerie di campioni quando utilizzato con saggi convalidati. Il kit è previsto per l'uso con lo strumento NextSeq 550Dx e software analitici.

Principi della procedura

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cicli) è un set di reagenti e materiali di consumo monouso specializzato per il sequenziamento sullo strumento NextSeq 550Dx. Come input, NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cicli) utilizza librerie generate da DNA dove gli indici campione e le sequenze di cattura sono state aggiunte ai target amplificati. 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. Il numero di librerie di campioni dipende dal multiplex supportato dal metodo di preparazione delle librerie a monte.

L'inserito della confezione dello *strumento NextSeq 550Dx* fornisce le istruzioni per eseguire il sequenziamento sullo strumento NextSeq 550Dx.

Le caratteristiche delle prestazioni e le limitazioni della procedura per NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cicli) sono state stabilite utilizzando i moduli Germline Variant e Somatic Variant di Local Run Manager.

Limiti della procedura

- 1 Per uso diagnostico *in vitro*.
- 2 Il software del saggio non allinea le letture con indel (inserzioni, delezioni o combinazioni) in cui la lunghezza del contenuto è superiore a 25 coppie di basi (bp). Di conseguenza, le indel di lunghezza superiore a 25 bp non sono rilevabili dal software del saggio.
- 3 Il software del saggio potrebbe non allineare le letture degli ampliconi con contenuto estremo. In questo caso, la regione viene segnalata come wild type. Tale contenuto estremo include:
 - ▶ Letture contenenti più di tre indel
 - ▶ Letture con lunghezza di almeno 30 bp e con contenuto di variante di singolo nucleotide (SNV, Single Nucleotide Variant) 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)
- 4 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.

- 5 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.
- 6 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.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 Non sono state convalidate piccole MNV e vengono solo riportate nel modulo Somatic Variant.
- 10 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.
- 11 Limitazioni specifiche per il modulo Germline Variant:
 - ▶ Lo strumento NextSeq 550Dx, utilizzando il modulo Germline Variant di Local Run Manager per NextSeq 550Dx, 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 ripetutamente 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).
 - ▶ Una indel e una SNV su un singolo locus possono risultare in una sola variante riportata.
- 12 Limitazioni specifiche per il modulo Somatic Variant:
 - ▶ Lo strumento NextSeq 550Dx, utilizzando il modulo Somatic Variant di Local Run Manager per NextSeq 550Dx, è progettato per offrire risultati qualitativi per l'identificazione di varianti somatiche (ad es., presenza di una variante somatica con una frequenza della variante $\geq 0,026$ con un limite del 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 kit di reagenti

Ciascun componente di NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cicli) è fornito in una scatola separata. Mettere subito i componenti nel luogo di conservazione alla temperatura indicata per assicurare prestazioni ottimali. Segue un elenco dei componenti del kit di reagenti.

Tabella 1 Componenti del kit di reagenti

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Descrizione	Conservazione*
NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicli)	1 ciascuna	Diversi	Reagenti per la generazione di cluster e per il sequenziamento	Tra -25 °C e -15 °C
NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cicli)	1 ciascuna	Diversi	Tamponi e soluzione di lavaggio	Tra 15 °C e 30 °C
NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cicli)	1 ciascuna	N/A	Cella a flusso in vetro, paired-end, monouso	Tra 2 °C e 8 °C
NextSeq 550Dx Accessory Box (300 cicli)	1 provetta	12 ml	Tampone di diluizione della libreria	tra -25 °C e -15 °C

*NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cicli) viene spedita a temperatura ambiente.

Numeri di lotto

Il kit di reagenti presenta un singolo numero di lotto, a cui si fa riferimento come numero di lotto del kit di reagenti. Su ogni scatola contenuta nel kit di reagenti è stampato il numero di lotto del kit di reagenti. Sui componenti del kit di reagenti contenuti all'interno delle scatole sono stampati i numeri di lotto specifici per i componenti. Questi numeri sono diversi dal numero di lotto del kit di reagenti. Conservare i materiali di consumo per il sequenziamento nelle loro scatole fino al momento dell'utilizzo per preservare l'associazione al lotto del kit. Per i dettagli sui numeri di codice e sui numeri di lotto dei reagenti, fare riferimento al certificato di analisi del kit di reagenti.

Conservazione e manipolazione

- 1 Per temperatura ambiente si intende la temperatura compresa tra 15 °C e 30 °C.
- 2 I componenti del kit di reagenti sono stabili se conservati alle temperature di conservazione indicate e fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.
- 3 La scatola di accessori NextSeq 550Dx e la cartuccia di reagenti NextSeq 550Dx sono stabili per al massimo uno scongelamento a temperatura ambiente prima della data di scadenza indicata. La cartuccia di reagenti, se scongelata in bagno d'acqua a temperatura ambiente, è stabile per un massimo di sei ore. Oppure, la cartuccia di reagenti può essere scongelata a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C fino a cinque giorni prima dell'uso.

- 4 Cambiamenti nell'aspetto fisico dei reagenti possono indicare un deterioramento dei materiali. Non utilizzare i reagenti se, dopo la miscelazione, si dovessero verificare evidenti cambiamenti nel colore del reagente od opacità visibile con contaminazione microbica.

Apparecchiature e materiali di consumo richiesti, venduti separatamente

- Strumento NextSeq 550Dx, n. di catalogo 20005715

Avvertenze e precauzioni



ATTENZIONE

La legge federale stabilisce che la vendita, l'uso o l'indicazione all'uso di questo dispositivo deve avvenire da parte o dietro prescrizione di un medico autorizzato dalla legge dello stato in cui esercita.

- 1 NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cicli) contiene 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 usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni applicabili a livello regionale, nazionale e locale.
- 2 Per maggiori informazioni sulle considerazioni ambientali, sulla sicurezza e sulla salute, vedere le schede di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS) alla pagina Web support.illumina.com/sds.html.
- 3 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.
- 4 Il mancato rispetto delle procedure descritte può produrre risultati errati o una riduzione significativa della qualità del campione.
- 5 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.
- 6 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.
- 7 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).

Istruzioni per l'uso

Fare riferimento all'insero della confezione per lo *strumento NextSeq 550Dx* e alle guide di consultazione rilevanti.

Caratteristiche delle prestazioni

Fare riferimento all'insero della confezione dello *strumento NextSeq 550Dx*.

Cronologia revisioni

Documento	Data	Descrizione della modifica
Documento n. 100000073349 v03	Novembre 2021	Aggiunta la dichiarazione Avvertenze e precauzioni sulla segnalazione di incidenti gravi. 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 similari 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

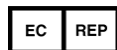
San Diego, California 92122 U.S.A.

+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.