

# MiSeq™ Dx Reagent Kit v3

FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

## Verwendungszweck

Das MiSeqDx Reagent Kit v3 von Illumina ist ein Satz von Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die Sequenzierung von Probenbibliotheken bei Verwendung von validierten Assays. Das MiSeqDx Reagent Kit v3 ist zur Verwendung mit dem MiSeqDx Instrument und Analysesoftware vorgesehen.

## Verfahrensprinzipien

Für die Zugabe nutzt das MiSeqDx Reagent Kit v3 aus DNA vorbereitete Bibliotheken, bei denen den Targets Probenindizes und Erfassungssequenzen hinzugefügt werden. Die Probenbibliotheken werden auf einer Fließzelle erfasst und auf dem Gerät unter Verwendung von SBS-Chemie (Sequencing by Synthesis, Sequenzierung durch Synthese) sequenziert. Die SBS-Chemie verwendet eine Methode mit reversiblen Terminatoren, um einzelne mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Nukleotidbasen zu erkennen, die in wachsende DNA-Stränge eingebaut sind.

Weitere Informationen zur Durchführung einer Sequenzierung auf dem MiSeqDx Instrument finden Sie in der Packungsbeilage zum MiSeqDx Instrument für Ihre Region und die jeweilige Version der Gerätesoftware.

## Einschränkungen des Verfahrens

- Für *In-vitro*-Diagnostik.
- Die in dieser Packungsbeilage erläuterten Einschränkungen wurden anhand repräsentativer Assays und Softwaremodule ermittelt, einschließlich der Local Run Manager-Module Germline Variant (für Keimbahnvarianten) und Somatic Variant (für somatische Varianten), die zur Leistungsbeurteilung mit repräsentativen Assays entwickelt wurden.
- Reads, die Insertionen, Deletionen oder Kombinationen von beiden (Indels) enthalten. Inhalte mit einer Länge > 25 bp werden von der Assay-Software nicht aligniert. Folglich können Indels mit einer Länge > 25 Basenpaaren (bp) von der Assay-Software nicht erkannt werden.

- Bei Verwendung der Softwaremodule Germline Variant und Somatic Variant wurde das System für die Erkennung von Einzelnukleotidvarianten (SNVs) sowie für Deletionen bis zu einer Länge von 25 bp und Insertionen bis zu einer Länge von 24 bp validiert. Beim Calling somatischer Varianten wurden bei einer Variantenhäufigkeit von 0,05 Deletionen mit einer Länge von 25 bp und Insertionen mit einer Länge von 18 bp gefunden.
- Amplikon-Reads mit extremen Varianteninhalten werden möglicherweise von der Assay-Software nicht aligniert, was dazu führt, dass die Region als Wildtyp gemeldet wird. Zu extremen Inhalten gehören:
  - Reads mit mehr als drei Indels
  - Reads mit einer Länge von mindestens 30 bp und einem SNV-Inhalt > 4 % der Gesamtlänge des Amplikon-Targets (außer Sondenregionen)
  - Reads mit einer Länge < 30 bp und einem SNV-Inhalt > 10 % der Gesamtlänge des Amplikons (einschließlich Sondenregionen)
- Große Varianten wie Mehrfachnukleotidvarianten (MNV) und große Indels werden in der Ausgabe-VCF-Datei möglicherweise als separate kleinere Varianten aufgeführt.
- Deletions-Varianten werden ggf. herausgefiltert oder verpasst, wenn sie zwei Amplikons auf der Platte umfassen und die Länge der Deletion der Überlappung der beiden Amplikons entspricht oder diese übertrifft.
- Das System kann keine Indels erkennen, wenn diese unmittelbar an einen Primer angrenzend auftreten und es kein überlappendes Amplikon gibt. Der Assay kann in Regionen mit überlappenden Amplikons keine Deletionen erkennen, wenn die überlappende Region kleiner als die zu erkennende Deletion ist. Wenn es sich bei der überlappenden Region zwischen zwei angrenzenden Amplikons beispielsweise um zwei Basen handelt, kann der Assay keine Deletionen erkennen, die beide Basen umfassen. Die Deletion einer einzelnen Base bei einer dieser Basen kann erkannt werden.
- Wie bei jedem auf Hybridisierung basierenden Workflow zur Bibliotheksvorbereitung können zugrunde liegende Polymorphismen, Mutationen, Insertionen oder Deletionen in Oligonukleotid-bindenden Regionen die untersuchten Allele und folglich die Anzahl der während der Sequenzierung erfolgten Calls beeinträchtigen. Beispiele:
  - Eine Variante in der Phase mit einer Variante in der Primer-Region wird möglicherweise nicht amplifiziert, was zu einem falsch negativen Ergebnis führt.
  - Varianten in der Primer-Region könnten die Amplifikation des Referenz-Allels verhindern, was zu einem fehlerhaften homozygoten Varianten-Call führt.
  - Indel-Varianten in der Primer-Region können an dem an den Primer angrenzenden Read-Ende zu einem falsch positiven Call führen.
- Indels können aufgrund von Strangverzerrungen herausgefiltert werden, wenn sie in der Nähe eines Read-Endes auftreten und während des Alignments einem Soft-Clipping unterzogen werden.
- Kleine MNVs wurden nicht validiert und werden nur im Modul Somatic Variant gemeldet.

- Deletionen werden in der VCF an der Koordinate der vorhergehenden Base gemäß VCF-Format ausgegeben. Daher müssen benachbarte Varianten in Betracht gezogen werden, bevor ein individueller Base-Call als homozygote Referenz in den Bericht aufgenommen wird.
- Keimbahn-spezifische Einschränkungen:
  - Das MiSeqDx Instrument generiert unter Verwendung des Local Run Manager-Moduls Germline Variant qualitative Ergebnisse für das Keimbahn-Varianten-Calling (z. B. homozygote, heterozygote oder Wildtyp-Ergebnisse).
  - Bei Verwendung in Kombination mit dem Modul Germline Variant beträgt die für ein genaues Varianten-Calling benötigte Mindest-Coverage pro Amplikon das 150-Fache. Daher werden 150 DNA-Fragmente benötigt, was 300 überlappenden Paired-End-Reads entspricht. Die Anzahl der Proben und die Gesamtzahl der Zielbasen beeinflussen die Coverage. GC-Inhalt und andere genomische Inhalte können die Coverage beeinträchtigen.
  - Kopienzahlvarianten haben einen Einfluss darauf, ob eine Variante als homozygot oder heterozygot identifiziert wird.
  - Varianten in bestimmten repetitiven Kontexten werden in den VCF-Dateien herausgefiltert. Der RMxN-Wiederholungsfiter wird verwendet, um Varianten zu filtern, wenn die gesamte oder ein Teil der Variantensequenz im Referenzgenom angrenzend an die Variantenposition wiederholt vorkommt. Beim Keimbahn-Varianten-Calling werden Varianten nur dann gefiltert, wenn mindestens neun Wiederholungen vorhanden sind. Dabei werden nur Wiederholungen mit Längen von bis zu 5 bp (R5 x 9) berücksichtigt.
- Spezifische Einschränkungen für somatische Varianten:
  - Bei Verwendung des Local Run Manager-Moduls Somatic Variant ist das MiSeqDx Instrument darauf ausgelegt, qualitative Ergebnisse für das Calling von somatischen Varianten (z. B. das Vorhandensein einer somatischen Variante mit einer Variantenhäufigkeit von  $\geq 0,026$  mit einer Nachweisgrenze von 0,05) zu liefern.
  - Bei Verwendung in Kombination mit dem Modul Somatic Variant beträgt die für ein genaues Varianten-Calling benötigte Mindest-Coverage pro Amplikon das 450-Fache pro Oligonukleotid-Pool. Daher werden pro Oligonukleotid-Pool 450 DNA-Fragmente benötigt, was 900 überlappenden Paired-End-Reads entspricht. Die Anzahl der Proben und die Gesamtzahl der Zielbasen beeinflussen die Coverage. GC-Inhalt und andere genomische Inhalte können die Coverage beeinträchtigen.
  - Beim Calling somatischer Varianten werden Varianten nur dann gefiltert, wenn mindestens sechs Wiederholungen in der Referenz vorhanden sind. Dabei werden nur Wiederholungen mit Längen von bis zu 3 bp (R3 x 6) berücksichtigt.
  - Das Modul für somatische Varianten kann nicht zwischen Keimbahn- und somatischen Varianten unterscheiden. Das Modul ist darauf ausgelegt, Varianten über einen Bereich von Variantenhäufigkeiten hinweg zu erkennen. Jedoch kann die Variantenhäufigkeit nicht dazu verwendet werden, um somatische Varianten von Keimbahn-Varianten zu unterscheiden.

- Normales Gewebe in der Probe beeinträchtigt die Erkennung von Varianten. Die gemeldete Nachweisgrenze basiert auf einer Variantenhäufigkeit bezogen auf die Gesamt-DNA, die aus dem Tumor und aus normalem Gewebe extrahiert wurde.

## Produktkomponenten

Illumina MiSeqDx Reagent Kit v3, Katalog-Nr. 20037124 besteht aus folgenden Komponenten:

- Bibliotheksverdünnungspuffer, Fließzelle und Nachamplifikationsreagenzien

## Bereitgestellte Reagenzien

Das Illumina MiSeqDx Reagent Kit v3 ist ein Satz von Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für den Einmalgebrauch zur Sequenzierung. Es kann für einen Sequenzierungslauf mit einer oder mehreren Probenbibliotheken auf dem MiSeqDx Instrument verwendet werden. Die Anzahl der Probenbibliotheken hängt vom Multiplexing ab, das von der Upstream-Bibliotheksvorbereitungsmethode unterstützt wird.

Die folgenden Tabellen bieten eine vollständige Liste der in diesem Kit bereitgestellten Reagenzien.

### MiSeqDx Reagent Kit v3, Karton 1

Tabelle 1 Karton 1: Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllvolumen	Erläuterung	Lagerung
Library Dilution Buffer	1 Rörchen	4,5 ml	Gepufferte wässrige Lösung	-25 °C bis -15 °C
MiSeqDx Reagent v3 Cartridge (mit RFID-Kennzeichnung)	je 1	Unterschiedlich	Vorgefüllte Kartusche für den Einmalgebrauch	-25 °C bis -15 °C

## MiSeqDx Reagent Kit v3, Karton 2

Tabelle 2 Karton 2: Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllvolumen	Erläuterung	Lagerung
MiSeqDx SBS Solution (PR2) (mit RFID-Kennzeichnung)	1 Flasche	500 ml	Gepufferte wässrige Lösung	2 °C bis 8 °C
MiSeqDx Flow Cell (mit RFID-Kennzeichnung)	je 1	n. z.	Paired-End-Fließzelle aus Glas für den Einmalgebrauch in gepufferter wässriger Lösung	2 °C bis 8 °C

## Lagerung und Handhabung

- Die Raumtemperatur ist mit 15 °C bis 30 °C definiert.
- Die folgenden Reagenzien werden gefroren ausgeliefert und sind stabil, wenn sie bis zum angegebenen Verfallsdatum bei -25 °C bis -15 °C gelagert werden.
  - Library Dilution Buffer
  - MiSeqDx Reagent v3 Cartridge

**HINWEIS:** Library Dilution Buffer und MiSeqDx Reagent v3 Cartridge sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Sie sind vor dem angegebenen Verfallsdatum für maximal einen Auftauvorgang bei Raumtemperatur stabil. Einmal aufgetaut, muss die Reagenzienkartusche mit der Probenbibliothek beladen werden und auf dem MiSeqDx Instrument muss umgehend ein Sequenzierunslauf gestartet werden. Alternativ kann die aufgetaute Reagenzienkartusche bis zu 6 Stunden bei 2 °C bis 8 °C aufbewahrt werden. Sie muss spätestens dann mit der Probenbibliothek geladen werden und anschließend muss auf dem MiSeqDx Instrument umgehend ein Sequenzierunslauf gestartet werden.

- Die folgenden Reagenzien werden gekühlt ausgeliefert und sind bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil, wenn sie bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.
  - MiSeqDx SBS Solution (PR2)
  - MiSeqDx Flow Cell
 MiSeqDx SBS Solution (PR2) und MiSeqDx Flow Cell sind nur für den einmaligen Gebrauch vorgesehen.

- Änderungen der physischen Struktur der Reagenzien können auf eine Schädigung der Materialien hindeuten. Verwenden Sie die Reagenzien nicht, wenn Änderungen an der physischen Struktur auftreten (z. B. offensichtliche Veränderungen der Reagenzienfarbe oder Eintrübung mit offenkundiger Keimkontamination).

## Erforderliche, separat erhältliche Geräte und Materialien

- **MiseqDx Instrument**, Katalog-Nr. DX-410-1001

## Warn- und Vorsichtshinweise



### VORSICHT

Gemäß geltenden Gesetzen ist der Verkauf oder die Nutzung dieses Geräts nur über einen Arzt bzw. im Auftrag eines Arztes oder einer anderen Fachperson mit entsprechender Lizenz zulässig.



### WARNUNG

**Diese Reagenzien enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Tragen Sie eine entsprechende für das Expositionsrisiko geeignete Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, Handschuhen und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (SDS, Safety Data Sheet) unter [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).**

(Weitere Informationen hierzu finden Sie unter „Reagenzien“ auf Seite 1.)

- Wenn die beschriebenen Verfahren nicht eingehalten werden, kann dies zu fehlerhaften Ergebnissen oder einer wesentlichen Abnahme der Probenqualität führen.
- Wenden Sie die routinemäßigen Vorsichtsmaßnahmen für das Labor an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Essen, trinken oder rauchen Sie nicht in ausgewiesenen Arbeitsbereichen. Tragen Sie beim Umgang mit Proben und Assay-Reagenzien Einweghandschuhe und einen Laborkittel. Waschen Sie sich nach dem Umgang mit Proben und Assay-Reagenzien gründlich die Hände.

- Ordnungsgemäße Laborpraktiken und eine gute Laborhygiene sind unerlässlich, um eine Kontamination von Reagenzien, Instrumenten und Proben genomischer DNA durch PCR-Produkte zu verhindern. Eine Kontamination durch PCR-Produkte kann zu falschen und unzuverlässigen Ergebnissen führen.
- Stellen Sie zur Verhinderung einer Kontamination sicher, dass die Voramplifikations- und Nachamplifikationsbereiche über dafür vorgesehene Gerätschaften (z. B. Pipetten, Pipettenspitzen, Vortexer und Zentrifuge) verfügen.
- Die Index-Proben-Paarung muss genau dem ausgedruckten Platten-Layout entsprechen. Local Run Manager füllt die Index-Primer automatisch mit den zugehörigen Probenamen aus, wenn diese in das Modul eingegeben werden. Überprüfen Sie die den Proben zugeordneten Index-Primer, bevor Sie den Sequenzierungslauf starten. Abweichungen zwischen der Probe und dem ausgedruckten Platten-Layout führen zu einem Verlust der positiven Probenidentifikation und zu fehlerhaften Ergebnisberichten.
- Melden Sie schwerwiegende Vorkommnisse in Zusammenhang mit diesem Produkt unmittelbar an Illumina und die zuständigen Behörden des Mitgliedlandes, in dem sich Anwender und/oder Patient befinden.

## Gebrauchsanweisung

Weitere Informationen finden Sie in der Packungsbeilage zum MiSeqDx Instrument für Ihre Region und die jeweilige Version der Gerätesoftware.

## Leistungsmerkmale

Weitere Informationen finden Sie in der Packungsbeilage zum MiSeqDx Instrument für Ihre Region und die jeweilige Version der Gerätesoftware.

# Versionshistorie

Dokument-Nr.	Datum	Beschreibung der Änderung
Dokument-Nr. 1000000030849 v04	November 2021	Verweise auf die Packungsbeilage zum MiSeqDx Instrument aktualisiert. Einschränkungen des Verfahrens sowie Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen präzisiert. Geringfügige Anpassungen in Bezug auf die Stilvorgaben und Standards für die Dokumentation von Illumina durchgeführt.
Dokument-Nr. 1000000030849 v03	August 2021	Adresse der autorisierten europäischen Vertretung aktualisiert. Tabelle mit Versionshistorie hinzugefügt.

# Patente und Marken

Dieses Dokument und dessen Inhalt sind Eigentum von Illumina, Inc. sowie deren Partner-/Tochterunternehmen („Illumina“) und ausschließlich für den bestimmungsgemäßen Gebrauch durch den Kunden in Verbindung mit der Verwendung des hier beschriebenen Produkts/der hier beschriebenen Produkte und für keinen anderen Bestimmungszweck ausgelegt. Dieses Handbuch und dessen Inhalt dürfen ohne schriftliches Einverständnis von Illumina zu keinem anderen Zweck verwendet, verteilt bzw. anderweitig übermittelt, offengelegt oder auf irgendeine Weise reproduziert werden. Illumina überträgt mit diesem Dokument keine Lizenzen unter seinem Patent, Markenzeichen, Urheberrecht oder bürgerlichem Recht bzw. ähnlichen Rechten an Drittparteien.

Die Anweisungen in diesem Dokument müssen von qualifiziertem und entsprechend ausgebildetem Personal genau befolgt werden, damit die in diesem Dokument beschriebene Anwendung der Produkte sicher und ordnungsgemäß erfolgt. Vor der Verwendung dieser Produkte muss der Inhalt dieses Dokuments vollständig gelesen und verstanden worden sein.

FALLS NICHT ALLE HIERIN AUFGEFÜHRTEN ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE ANDERWEITIGER SACHSCHADEN EINTRETEN UND JEDLICHE FÜR DAS PRODUKT/DIE PRODUKTE GELTENDE GEWÄHRLEISTUNG ERLISCHT.

ILLUMINA ÜBERNIMMT KEINERLEI HAFTUNG FÜR SCHÄDEN, DIE AUS DER UNSACHGEMÄSSEN VERWENDUNG DER HIERIN BESCHRIEBENEN PRODUKTE (EINSCHLIESSLICH TEILEN HIERVON ODER DER SOFTWARE) ENTSTEHEN.

© 2021 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Eigentümer. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).



# Kontaktinformationen



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, Kalifornien 92122, USA  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (außerhalb von Nordamerika)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

## **Australische Niederlassung**

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

# Produktkennzeichnungen

Eine Erläuterung sämtlicher Symbole, die auf der Produktverpackung sowie bei der Produktkennzeichnung verwendet werden, finden Sie in der Symbollegende für Ihr Kit unter „support.illumina.com“.