

# MiSeq™ Dx Reagent Kit v3

PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*

## Uso previsto

MiSeqDx Reagent Kit v3 de Illumina es un conjunto de reactivos y consumibles que se utiliza para la secuenciación de bibliotecas de muestras con ensayos validados. MiSeqDx Reagent Kit v3 está diseñado para su uso con el instrumento MiSeqDx y el software de análisis.

## Principios del procedimiento

MiSeqDx Reagent Kit v3 emplea en sus entradas bibliotecas que se han preparado con ADN y en las que los índices de las muestras y las secuencias de captura se han añadido a los objetivos. Las bibliotecas de muestras se capturan en una celda de flujo y se secuencian en el instrumento por medio del proceso químico de secuenciación por síntesis (SBS, sequencing by synthesis). El proceso químico de SBS utiliza un método basado en terminadores reversibles para detectar bases de nucleótidos únicos marcados con tinta fluorescente a medida que se incorporan a las cadenas de ADN en crecimiento.

Para obtener instrucciones sobre la secuenciación en el instrumento MiSeqDx, consulte las instrucciones de uso de MiSeqDx Instrument en su región y la versión del software del instrumento.

## Limitaciones del procedimiento

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Las limitaciones que se describen en estas instrucciones de uso se basan en los ensayos representativos y los módulos del software, incluidos los módulos Germline Variant (Variante germinal) y Somatic Variant (Variante somática) de Local Run Manager, que se desarrollaron para evaluar el rendimiento con ensayos representativos.
- Lecturas que incluyen inserciones, deleciones o combinaciones de ambas (indel). El software del ensayo no alineará el contenido cuya longitud sea superior a 25 pares de bases (pb). Por lo tanto, el software del ensayo no detectará las indel con una longitud superior a los 25 pb.

- El sistema se ha validado para detectar variantes de nucleótido único (SNV, single nucleotide variants) con un máximo de deleciones de 25 pb y un máximo de inserciones de 24 pb siempre que se utilice con el software de los módulos Germline y Somatic Variant (Variante germinal y somática). En las llamadas de variantes somáticas se detectaron deleciones de 25 pb e inserciones de 18 pb con una frecuencia de variantes de 0,05.
- Es posible que el software del ensayo no alinee las lecturas de amplicones que contienen una cantidad excesiva de variantes y, en consecuencia, se informará de que la región se encuentra en estado natural. El contenido excesivo incluye:
  - Lecturas que contienen más de tres inserciones y deleciones
  - Lecturas cuya longitud es de al menos 30 pb y cuyo contenido de SNV es superior al 4 % de la longitud total del amplicón objetivo (sin tener en cuenta las regiones de sonda)
  - Lecturas cuya longitud es inferior a 30 pb y cuyo contenido de SNV es superior al 10 % de la longitud total del amplicón (incluidas las regiones de sonda)
- Es posible que las variantes de mayor tamaño, incluidas las variantes de nucleótidos múltiples (MNV, multi-nucleotide variants) y las inserciones y deleciones de gran tamaño, aparezcan en el archivo VCF de resultados por separado como variantes de menor tamaño.
- Cuando se cubren dos amplicones en la placa, es posible que las variantes de deleción se omitan o queden filtradas si la longitud de la deleción es mayor o igual que la región de solapamiento entre los amplicones de la placa.
- El sistema no puede detectar indel si son directamente adyacentes a un cebador y no existe solapamiento de amplicones. Con respecto a las regiones con amplicones solapados, el ensayo no puede detectar deleciones cuando la región de solapamiento es más pequeña que el tamaño de la deleción que se desea detectar. Por ejemplo, si la región de solapamiento entre dos amplicones adyacentes tiene dos bases, el ensayo no puede detectar deleciones que incluyan esas dos bases. Una deleción de base individual en cualquiera de esas dos bases se puede detectar.
- Como con cualquier flujo de trabajo de preparación de bibliotecas basado en hibridación, los polimorfismos, las mutaciones, las inserciones o las deleciones subyacentes en regiones de unión de oligonucleótidos pueden afectar a los alelos que se comprueban y, en consecuencia, a las llamadas que se han realizado durante la secuenciación. Por ejemplo:
  - Una variante en fase que contiene una variante en la región del cebador podría no amplificarse, lo que conllevaría un falso negativo.
  - Es posible que las variantes que se sitúan en la región del cebador impidan la amplificación del alelo de referencia, lo que conllevaría una llamada de variantes homocigóticas errónea.
  - Las variantes de indel que se encuentran en la región del cebador pueden provocar un falso positivo en la llamada en la parte final de la lectura de las posiciones adyacentes a un cebador.
- Las indel pueden quedar filtradas a causa de cortes en la cadena si están situadas en la parte final de una lectura y se han truncado levemente durante la alineación.
- Las variantes MNV de menor tamaño no se han validado y solo se identifican en el módulo Somatic Variant (variante somática).

- Las deleciones se identifican en el archivo VCF en la coordenada de la base precedente de cada formato VCF. Por lo tanto, se deben considerar las variantes adyacentes antes de identificar una llamada de bases individual como una referencia homocigótica.
- Limitaciones específicas de Germline:
  - El instrumento MiSeqDx, con el uso del módulo Germline Variant (Variante germinal) de Local Run Manager, se ha diseñado para ofrecer resultados cualitativos en las llamadas de variantes de línea germinal (p. ej., homocigóticas, heterocigóticas, estado natural).
  - Para utilizar el módulo Germline Variant (Variante germinal) es necesaria una cobertura mínima de 150x por amplicón para que la llamada de variantes sea precisa. Por lo tanto, se precisan 150 fragmentos con ADN, lo que equivale a 300 lecturas "paired-end" solapadas. La cantidad de muestras y el número total de bases que se van a estudiar influirán en la cobertura. El contenido de GC, así como otros contenidos genómicos, también influyen en la cobertura.
  - La variación en el número de copias puede influir en la identificación de una variante como homocigótica o heterocigótica.
  - Las variantes que se encuentran en un contexto repetitivo determinado se filtran en los archivos VCF. El filtro RMxN para las repeticiones se utiliza para filtrar variantes en caso de que la secuencia de la variante aparezca varias veces, en parte o en su totalidad, en el genoma de referencia adyacente a la posición de la variante. En el caso de las llamadas de variantes de línea germinal, es necesario que existan al menos nueve repeticiones en la referencia para que se filtre la variante, y únicamente se tienen en cuenta las repeticiones con una longitud de hasta cinco pares de bases (R5x9).
- Limitaciones específicas de Somatic:
  - El sistema MiSeqDx, con el uso del módulo Somatic Variant (Variante somática) de Local Run Manager se ha diseñado para ofrecer resultados cualitativos en las llamadas de variantes somáticas (p. ej., la presencia de una variante somática con una frecuencia de variante mayor o igual a 0,026 con un límite de detección de 0,05).
  - Para utilizar el módulo Somatic Variant (Variante somática) es necesaria una cobertura mínima por amplicón de 450x por grupo de oligonucleótidos para que la llamada de variantes sea precisa. Por lo tanto, se precisan 450 fragmentos con ADN por grupo de oligonucleótidos, lo que equivale a 900 lecturas "paired-end" solapadas. La cantidad de muestras y el número total de bases que se van a estudiar influirán en la cobertura. El contenido de GC, así como otros contenidos genómicos, también influyen en la cobertura.
  - En el caso de las llamadas de variante somática, es necesario que existan al menos seis repeticiones en la referencia para que se filtre la variante, y únicamente se tienen en cuenta las repeticiones con una longitud de hasta tres pares de bases (R3x6).
  - El módulo Somatic Variant (Variante somática) no es capaz de diferenciar entre las variantes germinales y las variantes somáticas. Aunque el módulo se ha diseñado para detectar las variantes dentro de un espectro de frecuencias de variantes, no es posible utilizar las frecuencias para diferenciar las variantes germinales de las somáticas.

- El tejido común que se encuentre en la muestra puede influir en la detección de las variantes. El límite de detección se basa en una frecuencia de variante relativa al total de ADN que se ha extraído del tumor y del tejido común.

## Componentes del producto

MiSeqDx Reagent Kit v3 de Illumina, n.º de catálogo 20037124 consta de lo siguiente:

- Tampón de dilución de biblioteca, celda de flujo y reactivos de posamplificación

## Reactivos suministrados

MiSeqDx Reagent Kit v3 de Illumina es un conjunto de reactivos y consumibles de un solo uso que se utiliza para llevar a cabo un experimento de secuenciación de una o varias bibliotecas de muestras en el instrumento MiSeqDx. La cantidad de bibliotecas de muestras depende del multiplexado que admita el método ascendente de preparación de bibliotecas.

Consulte las siguientes tablas para ver una lista completa de los reactivos que se suministran en este kit.

### MiSeqDx Reagent Kit v3, Box 1

Tabla 1 Box 1 Post-Amp Reagents

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Library Dilution Buffer (tampón de dilución de biblioteca)	1 tubo	4,5 ml	Solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
MiSeqDx Reagent v3 Cartridge (RFID-labeled) (cartucho de reactivo MiSeqDx v3, con etiqueta RFID)	Uno de cada	Varios	Cartucho cargado de un solo uso	Entre -25 °C y -15 °C

## MiSeqDx Reagent Kit v3, Box 2

Tabla 2 Box 2 Post-Amp Reagents

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
MiSeqDx SBS Solution (PR2) (RFID-labeled) (Solución SBS de MiSeqDx (PR2), con etiqueta RFID)	1 botella	500 ml	Solución acuosa tamponada	Entre 2 °C y 8 °C
MiSeqDx Flow Cell (RFID-labeled) (Celda de flujo de MiSeqDx, con etiqueta RFID)	Uno de cada	n. p.	Celda de flujo de cristal "paired-end" de un solo uso en solución acuosa tamponada	Entre 2 °C y 8 °C

## Almacenamiento y manipulación

- La temperatura ambiente se define como la temperatura que oscila entre 15 °C y 30 °C.
- Los siguientes reactivos se suministran congelados y permanecen estables cuando se almacenan a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C hasta la fecha de caducidad especificada.
  - Library Dilution Buffer (tampón de dilución de biblioteca)
  - MiSeqDx Reagent v3 Cartridge (cartucho de reactivos de MiSeqDx v3)

**NOTA:** El tampón de dilución de bibliotecas y MiSeqDx Reagent v3 Cartridge son de un solo uso y permanecen estables tras descongelarse a temperatura ambiente una única vez antes de la fecha de caducidad indicada. Una vez que se ha descongelado el cartucho de reactivos, se debe cargar con la biblioteca de muestras y debe utilizarse inmediatamente en el instrumento MiSeqDx. En caso de no ser así, el cartucho de reactivos ya descongelado puede mantenerse a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C durante un máximo de seis horas; después deberá cargarse con la biblioteca de muestras y utilizarse inmediatamente en el instrumento MiSeqDx.

- Los siguientes reactivos se suministran refrigerados y permanecen estables cuando se almacenan a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C hasta la fecha de caducidad indicada.
  - MiSeqDx SBS Solution (PR2) (solución SBS de MiSeqDx, PR2)

- MiSeqDx Flow Cell (celda de flujo de MiSeqDx)

La solución SBS de MiSeqDx (PR2) y la celda de flujo de MiSeqDx son artículos de un solo uso.

- Los cambios en el aspecto físico de los reactivos proporcionados pueden señalar el deterioro de los materiales. Si se producen cambios en el aspecto físico (tales como cambios evidentes en el color del reactivo o un aspecto turbio con contaminación microbiana), no utilice los reactivos.

## Materiales y equipo necesarios que se venden por separado

- **MiSeqDx Instrument**, n.º de catálogo DX-410-1001

## Advertencias y precauciones



### PRECAUCIÓN

Las leyes federales limitan la venta de este dispositivo a médicos u otros facultativos, o bajo prescripción de estos, que se encuentren autorizados en virtud de la legislación del estado en el que ejercen su profesión para utilizar u ordenar la utilización de este dispositivo.



### ADVERTENCIA

**Este conjunto de reactivos contiene sustancias químicas potencialmente peligrosas. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Utilice un equipo de protección, incluidos gafas, guantes y batas de laboratorio adecuados para el riesgo de exposición. Manipule los reactivos utilizados como residuos químicos y deséchelos de conformidad con las normativas y leyes regionales, nacionales y locales aplicables.** Para obtener más información medioambiental, sanitaria y de seguridad, consulte las hojas de datos de seguridad (SDS, Safety Data Sheets) en [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

(Para obtener más información, consulte la sección Reactivos que se encuentra en la página 1).

- El incumplimiento de los procedimientos descritos puede provocar resultados erróneos o una reducción considerable de la calidad de las muestras.
- Utilice las precauciones rutinarias del laboratorio. No pipetee con la boca. No coma, beba ni fume en las zonas de trabajo designadas. Utilice guantes desechables y batas de laboratorio para la manipulación de muestras y reactivos del ensayo. Lávese bien las manos tras la manipulación de muestras y reactivos del ensayo.

- Se precisan prácticas de laboratorio adecuadas y procedimientos óptimos en materia de higiene de laboratorio para evitar que los productos de PCR contaminen los reactivos, los instrumentos y las muestras de ADN genómico. La contaminación mediante PCR puede conllevar resultados poco precisos y fiables.
- Para evitar la contaminación, asegúrese de que las áreas de preamplificación y posamplificación dispongan de equipos específicos (tales como pipetas, puntas de pipeta, mezclador vorticial y centrifugadora).
- La asociación de las muestras con los índices debe coincidir de forma exacta con la disposición de la placa impresa. Local Run Manager se encarga de rellenar de forma automática los cebadores de índices que se han asociado con los nombres de las muestras cuando estos se introducen en el módulo. Compruebe los cebadores de índices que se han asignado a las muestras antes de comenzar el experimento de secuenciación. Las discrepancias entre la distribución de la placa que se ha imprimido y las muestras pueden tener como consecuencia que no se identifiquen las muestras positivas y que el informe de resultados sea erróneo.
- Comunique de inmediato cualquier incidente grave relacionado con este producto a Illumina y las autoridades competentes del Estado miembro en el que se encuentren el usuario y el paciente.

## Instrucciones de uso

Consulte las instrucciones de uso de MiSeqDx Instrument en su región y la versión del software del instrumento.

## Características de rendimiento

Consulte las instrucciones de uso de MiSeqDx Instrument en su región y la versión del software del instrumento.

# Historial de revisiones

N.º de documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de documento 100000030849_ esp v04	Noviembre de 2021	Se han actualizado las referencias en las instrucciones de uso de MiSeqDx Instrument. Se han actualizado las secciones Limitaciones del procedimiento y Advertencias y precauciones con aclaraciones adicionales. Se han hecho pequeñas actualizaciones para mantener la coherencia con el estilo y los estándares de Illumina.
N.º de documento 100000030849_ esp v03	Agosto 2021	Se ha modificado la dirección del representante autorizado en la UE. Se ha añadido la tabla Historial de revisiones.

# Patentes y marcas comerciales

Este documento y su contenido son propiedad exclusiva de Illumina, Inc. y sus afiliados ("Illumina") y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes en conexión con el uso de los productos descritos en él y no para ningún otro fin. Este documento y su contenido no se utilizarán ni distribuirán con ningún otro fin ni tampoco se comunicarán, divulgarán ni reproducirán en ninguna otra forma sin el consentimiento previo por escrito de Illumina. Illumina no transfiere mediante este documento ninguna licencia bajo sus derechos de patente, marca comercial, copyright ni derechos de autor o similares derechos de terceros.

Para asegurar el uso correcto y seguro de los productos descritos en este documento, el personal cualificado y adecuadamente capacitado debe seguir las instrucciones incluidas en este de manera rigurosa y expresa. Se debe leer y entender completamente todo el contenido de este documento antes de usar estos productos.

SI NO SE LEE COMPLETAMENTE EL DOCUMENTO Y NO SE SIGUEN EXPRESAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES DESCRITAS EN ESTE, PODRÍAN PRODUCIRSE DAÑOS EN EL PRODUCTO, LESIONES PERSONALES, INCLUIDOS LOS USUARIOS U OTRAS PERSONAS Y DAÑOS EN OTROS BIENES Y QUEDARÁ ANULADA TODA GARANTÍA APLICABLE AL PRODUCTO.

ILLUMINA NO ASUME RESPONSABILIDAD ALGUNA DERIVADA DEL USO INCORRECTO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS LAS PIEZAS O EL SOFTWARE).

© 2021 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Para obtener información específica sobre las marcas comerciales, consulte [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

# Información de contacto



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 (EE. UU.)  
+ 1 800 809 ILMN (4566)  
+ 1 858 202 4566 (fuera de Norteamérica)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



Illumina Netherlands B. V.  
Steenoven 19  
5626 DK Eindhoven  
Países Bajos

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

# Etiquetado de productos

Consulte la clave de símbolos de su kit en [support.illumina.com](http://support.illumina.com) para acceder a una referencia completa de símbolos que podrían aparecer en etiquetas y envases de productos.