

Kit CQ FFPE para Dx do amplicon personalizado TruSeq™

PARA UTILIZAÇÃO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

Catálogo n.º 20006259: de 1 a 4 usos, até 48 amostras

Uso previsto

O Kit CQ FFPE para Dx do amplicon personalizado TruSeq Illumina é um conjunto de reagentes usado para determinar o potencial de amplificação DNA genômico (gDNA) extraído de amostras fixadas com formalina e embebidas em parafina (FFPE).

Princípios do procedimento

O Kit CQ FFPE para Dx do amplicon personalizado TruSeq Illumina foi desenvolvido para avaliar a qualidade de possíveis amostras de DNA de tecido de FFPE para determinar se são viáveis para uso com o Kit Dx do amplicon personalizado TruSeq ou com outros kits de preparação de biblioteca. O kit usa um ensaio quantitativo de PCR (qPCR) em tempo real que pode ser desenvolvido com o uso de instrumentação padrão. O qPCR determina o potencial de amplificação de DNA extraído das amostras de FFPE.

Os requisitos de entrada de gDNA FFPE para preparação de biblioteca baseiam-se no ciclo quantitativo delta (dCq) obtido do kit. O dCq é a diferença entre o ciclo no qual uma amostra e um controle passam por um limite. Os reagentes fornecidos no Kit CQ FFPE para Dx do amplicon personalizado TruSeq amplificam especificamente regiões repetidas no processamento do genoma. A quantidade de bibliotecas depende da quantidade de gDNA amplificável, extraído das amostras de FFPE. Quanto mais alto o dCq das amostras, mais baixa será a quantidade de gDNA amplificável e mais alta a quantidade de DNA de entrada, necessária para a preparação da biblioteca.

Limitações do procedimento

- 1 Para utilização de diagnóstico *in vitro*.

Componentes do produto

- O Kit CQ FFPE para Dx do amplicon personalizado TruSeq Illumina consiste no seguinte:
- Kit CQ FFPE para Dx do amplicon personalizado TruSeq (Catálogo n.º 20006259)

Reagentes

Reagentes fornecidos

O Kit CQ FFPE para Dx do amplicon personalizado TruSeq Illumina foi configurado para processar 48 amostras. O kit tem suporte para quatro usos com 12 amostras por uso.

Consulte as tabelas abaixo para obter uma lista completa de reagentes fornecidos neste kit.

Kit CQ FFPE para Dx do amplicon personalizado TruSeq

Tabela 1 Caixa 1 Reagentes para pré-amplificação

Componente	Quantidade	Volume de enchimento	Ingredientes ativos	Armazenamento
Mistura master de qPCR	2 tubos	1 ml	Solução tampão aquosa contendo sais, dNTPs, polimerase de DNA, referência passiva e corante fluorescente verde (SYBR)	De -25 °C a -15 °C
Primers de controle de qualidade	4 tubos	75 µl	Solução tampão aquosa contendo oligonucleotídeos (primers) para qualificação da amostra de DNA	De -25 °C a -15 °C

Reagentes necessários, não fornecidos

- Solução tampão 1X TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0)
- Água livre de RNase/DNase

Armazenamento e manuseio

- 1 A temperatura ambiente é definida entre 15 °C e 30 °C.
- 2 Os seguintes reagentes são remetidos congelados e permanecem estáveis quando armazenados de -25 °C a -15 °C até a data de vencimento especificada.
 - ▶ Mistura master de qPCR
 - ▶ Primers de controle de qualidade

Os reagentes permanecem estáveis durante no máximo seis ciclos de congelamento-descongelamento que ocorram antes da data de vencimento especificada.
- 3 As mudanças na aparência física dos reagentes fornecidos podem indicar deterioração dos materiais. Se ocorrerem mudanças na aparência física (por exemplo, mudanças óbvias na coloração do reagente ou turbidez aparente com contaminação microbiana), não utilize os reagentes.

Equipamento e materiais

Equipamento e materiais necessários, não fornecidos

Equipamento e materiais para pré-amplificação

- 1 **Centrífuga de mesa** – Uma centrífuga de mesa colocada na área do laboratório de pré ou de pós-amplificação. A centrífuga deve atender às especificações a seguir.
 - ▶ Pode manter 20 °C
 - ▶ Encaixa-se em uma placa de 96 ou de 384 poços
 - ▶ Aceita tubos de 5 ml
 - ▶ Alcança velocidades de 280 a 2.400 × g
- 2 **Pipetas de precisão** – Será necessário um conjunto de pipetas de precisão. O uso de pipetas de precisão garante a distribuição precisa de reagente e amostra. Pode-se usar pipetas de um ou vários canais se forem calibradas regularmente e tiverem uma precisão de 5% do volume declarado.
- 3 **Materiais de consumo** – Os materiais de consumo a seguir serão necessários.
 - ▶ Tubos de 1,5 ml ou 2 ml
 - ▶ Tiras e tampas para 8 tubos
 - ▶ Placas PCR para 96 ou 384 poços, compatíveis com o instrumento para qPCR, 0,2 ml, polipropileno ou equivalente
 - ▶ Bacia de solução, PVC, DNase, livre de RNase (cuba)
 - ▶ Vedação compatível com instrumento para qPCR
 - ▶ Pontas de pipeta resistentes a aerossol

- 4 **Microcentrífuga**
- 5 **Agitador vórtex**
- 6 **DNA de controle de qualidade** – DNA humano de alto peso molecular, de fita dupla, disponível por meio de fornecedores comerciais ou isolado do sangue humano.

Equipamento e materiais para pós-amplificação

- 1 **Termociclador qPCR** – Um instrumento PCR quantitativo será necessário. O instrumento deve ter uma tampa aquecida e a capacidade de detectar o corante SYBR (canal FAM; filtro de excitação de ~490 nm e filtro de emissão de ~520 nm).

Coleta, transporte e armazenamento de espécimes

As condições a seguir devem ser atendidas ao manusear um tecido de tumor e o DNA extraído desse tecido.

- 1 O tecido do tumor deve ser fixado em formalina e embebido em parafina.
- 2 O gDNA extraído deve ser mantido entre 2 °C e 8 °C durante no máximo 28 dias ou armazenado congelado de -15 °C a -25 °C durante no máximo 161 dias.
- 3 As amostras congeladas de gDNA permanecem estáveis durante dois ciclos de congelamento-descongelamento.

Extração de DNA

A Illumina recomenda kits de extração de DNA com base em coluna, usando o dobro da quantidade de Proteinase K, incubações de Proteinase K durante a noite, com agitação e eluições finais em pelo menos um volume de 30 µl. Os métodos de extração baseados em beads, que usam apenas a dissolução de extratos não processados de células, não são recomendados para uso com estes reagentes.



OBSERVAÇÃO

Não foi observado nenhum efeito adverso no desempenho do kit com tecido FFPE quando estavam presentes quantidades em traços de solução de desparafinização, cera de parafina, xileno, etanol, Proteinase K, soluções de limpeza, hemoglobina ou tecido necrosado.

Alertas e precauções



CUIDADO

A lei federal restringe a venda deste dispositivo a um médico ou à ordem deste ou ainda a outro profissional de clínica geral licenciado segundo a legislação do estado no qual trabalha, para usar ou solicitar o uso do dispositivo.



ADVERTÊNCIA

Esse conjunto de reagentes contém produtos químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer ferimentos por meio de inalação, ingestão e contato com a pele ou com os olhos. Use equipamento de proteção, incluindo proteção para os olhos, luvas e jaleco, apropriado para risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduo químico e descarte-os de acordo com as leis e regulamentações regionais, nacionais e locais aplicáveis. Para obter mais informações ambientais, de saúde e de segurança, consulte a SDS em support.illumina.com/sds.html.

- 1 Manuseie todos as amostras de sangue como se fossem consideradas infecciosas para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus da hepatite B humana (HBV) e outros agentes patogênicos transmitidos pelo sangue (precauções universais).
- 2 Se os procedimentos não forem seguidos conforme o estabelecido, pode haver resultados com erro ou uma redução significativa na qualidade da amostra.

- 3 Adote precauções de rotina no laboratório. Não utilize a pipeta com a boca. Não coma, beba nem fume em áreas de trabalho designadas. Use luvas descartáveis e jalecos para laboratório ao manusear espécimes e kits de reagentes. Lave bem as mãos depois de manusear espécimes e kits de reagentes.
- 4 Não use nenhum componente do kit além da data de vencimento declarada no rótulo da caixa do kit. Não altere os componentes do kit entre lotes diferentes de kits. Observe que os lotes de kits são identificados no rótulo da caixa do kit.
- 5 Armazene os componentes do kit à temperatura especificada nas áreas designadas de pré e pós-amplificação.
- 6 Evite ciclos de congelamento-descongelamento repetidos dos reagentes. Consulte as *Observações do procedimento na página 4* quanto ao número de usos do kit.
- 7 Para evitar degradação das amostras ou dos reagentes, assegure-se de que todos os vapores de hipoclorito de sódio tenham se dissipado completamente antes do início do protocolo.
- 8 São obrigatórias as práticas apropriadas de laboratório e a boa higiene do laboratório para evitar que os produtos de PCR contaminem reagentes, a instrumentação e as amostras de DNA genômico. A contaminação de PCR pode provocar resultados imprecisos e não confiáveis.
- 9 Para evitar a contaminação, certifique-se de que as áreas de pré-amplificação e pós-amplificação tenham equipamento exclusivo (por exemplo, pipetas, pontas de pipeta, agitador vórtex e centrífuga).
- 10 Evite contaminação cruzada. Use pontas de pipetas novas entre as amostras e entre a distribuição de reagentes. Misture as amostras com uma pipeta e centrifugue a placa quando for indicado. Não agite as placas. O uso de pontas resistentes a aerossol reduz o risco de arraste de amplicons e de contaminação cruzada entre as amostras.
- 11 Os métodos de quantificação dependem de métodos de pipetagem precisos. Não use pipetas nos extremos das especificações de volume. Assegure-se de que as pipetas estejam calibradas.

Acrônimos

Tabela 2 Acrônimos do Kit CQ FFPE para Dx do amplicon personalizado TruSeq Illumina

Acrônimo	Definição
NTC	Sem controle de modelo
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa

Observações do procedimento

- 1 O kit pode ser usado até quatro vezes se forem classificadas menos de 96 amostras.
- 2 A Illumina exige que seja incluído um controle negativo (NTC ou Sem controle de modelo) em cada uso.
- 3 Qualifique o DNA usando o Kit CQ FFPE para Dx do amplicon personalizado TruSeq Illumina conforme descrito nas *Instruções de uso*. O rendimento da biblioteca e o desempenho do sequenciamento dependem da qualidade da amostra, conforme medido pelo Kit CQ FFPE para Dx do amplicon personalizado TruSeq.

Instruções de uso

Preparação

- 1 Coloque o DNA de controle de qualidade, os primers de controle de qualidade, a mistura master de qPCR e o gDNA em temperatura ambiente.
- 2 Agite os primers de controle de qualidade vigorosamente e centrifugue rapidamente os tubos para coletar líquido.
- 3 Inverta o DNA de controle, o gDNA e a mistura master de qPCR 10 vezes e centrifugue rapidamente os tubos para coletar líquido.
- 4 Coloque todos os tubos em gelo e proteja a mistura master de qPCR da luz ambiente.

- 5 Determine o layout da placa da reação de qPCR (use a **Figura 1 na página 5** como guia).

Procedimento

- 1 Prepare o DNA de controle de qualidade escolhendo uma das seguintes opções:
 - ▶ **[Opção 1] gDNA comercialmente disponível** – Dilua o DNA com base na concentração fornecida pelo fornecedor. Prepare pelo menos 50 µl de DNA de controle de qualidade a uma concentração de 0,25 ng/µl usando a solução tampão 1X TE.
 - ▶ **[Opção 2] gDNA extraído** – Determine a concentração com um espectrofotômetro e a solução tampão 1X TE como branco. Meça a amostra de gDNA em triplicata. O % CV deve ser menor ou igual a 20%. Repita as leituras da amostra se o % CV for maior que 20%. Prepare pelo menos 50 µl de DNA de controle de qualidade recém-diluído a 0,25 ng/µl usando a solução tampão 1X TE.
- 2 Determine o layout da placa da reação de qPCR (**Figura 1**). Teste o DNA de controle, NTC e cada gDNA de amostra em triplicata. Para calcular o número de poços, execute a seguinte etapa:
 - ▶ Número total de poços = 3 × [1 (DNA de controle) + 1 (NTC) + n.º de amostras de gDNA]
- 3 Em uma tira de 8 tubos de PCR, combine 148,5 µl de solução tampão 1X TE e 1,5 µl de gDNA de amostra para formar uma diluição de 100 vezes.
- 4 Com uma pipeta multicanal P200 ajustada a 100 µl, pipete para cima e para baixo 10 vezes, a fim de misturar as diluições.
- 5 Transfira 30 µl de 0,25 ng/µl de diluição de DNA de controle para um poço não utilizado na tira de 8 tubos de PCR.

Figura 1 Layout sugerido da placa para qPCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Amostra 1	Amostra 1	Amostra 1	Amostra 9	Amostra 9	Amostra 9						
B	Amostra 2	Amostra 2	Amostra 2	Amostra 10	Amostra 10	Amostra 10						
C	Amostra 3	Amostra 3	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 11	Amostra 11						
D	Amostra 4	Amostra 4	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 12	Amostra 12						
E	Amostra 5	Amostra 5	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 13	Amostra 13						
F	Amostra 6	Amostra 6	Amostra 6	Amostra 14	Amostra 14	Amostra 14						
G	Amostra 7	Amostra 7	Amostra 7	DNA de controle	DNA de controle	DNA de controle						
H	Amostra 8	Amostra 8	Amostra 8	NTC	NTC	NTC						

- 6 Adicione 150 µl de solução tampão 1X TE a outro poço não utilizado para uso como o NTC.
- 7 Tampe as tiras de 8 tubos e centrifugue ligeiramente para coletar o líquido.
- 8 Prepare uma quantidade suficiente de mistura de reação de qPCR para um formato de placa com 384 poços ou 96 poços com base no número de reações determinado na etapa 2. A **Tabela 3** relaciona os volumes de cada componente para uma reação simples. Adicione um volume extra para erro de pipetagem.

Tabela 3 Mistura de reação de qPCR

Componente da mistura de reação	Vol de 384 poços (µl)	Vol de 96 poços (µl)
Mistura master de qPCR	5	10
Primers de controle de qualidade	0,8	1,6
Água	2,2	4,4
Mistura de reação de volume por poço	8	16
Amostra	2	4
Volume total de reação por poço	10	20

- 9 Faça a mistura de reação com delicadeza, mas completamente. Centrifugue ligeiramente para coletar o líquido. Coloque a mistura de reação em gelo e proteja-a da luz até o uso.
- 10 Divida a mistura de reação em partes iguais em uma cuba ou em uma tira de 8 tubos para ajudar a distribuir com a pipeta multicanal.
- 11 Adicione 8 µl (formato de 384 poços) ou 16 µl (formato de 96 poços) da mistura de reação de qPCR a cada poço de amostra da placa de qPCR.

**CUIDADO**

Assegure-se de pipetar com precisão: pequenas variações afetarão o ensaio.

- 12 Adicione 2 µl (formato de 384 poços) ou 4 µl (formato de 96 poços) de 0,25 ng/µl de diluição de DNA de controle, as diluições de amostra de gDNA, ou solução tampão 1X TE a cada poço da placa (consulte a [Figura 1](#) para obter sugestões).

**CUIDADO**

Assegure-se de pipetar com precisão: pequenas variações afetarão o ensaio.

- 13 Com uma pipeta multicanal P20 defina pela metade o volume total de reação (5 µl para uma placa de 384 poços ou 10 µl para uma placa de 96 poços), pipetando lentamente para cima e para baixo três vezes, para misturar.
- 14 Vede a placa com uma vedação opticamente transparente, tomando cuidado para evitar contaminação cruzada e evitar sujar a superfície da vedação.
- 15 Centrifugue a placa a 1000 g a 20 °C durante 1 minuto.
- 16 Assegure-se de que a vedação e a placa estejam livres de qualquer líquido ou sujeira, coloque a placa no instrumento de qPCR na orientação correta e depois feche a tampa e execute o seguinte perfil térmico de qPCR (com uma tampa aquecida):
 - ▶ 50 °C durante 2 minutos
 - ▶ 95 °C durante 10 minutos
 - ▶ 40 ciclos de:
 - ▶ 95 °C durante 30 segundos
 - ▶ 57 °C durante 30 segundos
 - ▶ 72 °C durante 30 segundos
- 17 Confirme se o instrumento captura as imagens depois da etapa de 72 °C na etapa 16.
- 18 Faça a média do valor Cq das reações triplicadas do DNA de controle, NTC e de cada amostra. Trate os valores atípicos conforme especificado nos [Procedimentos de controle de qualidade na página 7](#).
- 19 Subtraia a média Cq do DNA de controle da média Cq de cada amostra (Cq da média de amostras menos Cq da média do DNA de controle) para produzir os valores dCq de cada amostra. Registre os valores dCq, todas as réplicas que foram excluídas e os fatores de diluição da amostra. Para amostras com dCq ≤ -1,5, dilua a amostra 16 vezes e repita a medida dCq até que o valor seja > -1,5. Para a preparação de biblioteca com o uso do kit Dx TSCA, siga as instruções de diluição da amostra para o grupo aplicável:

- ▶ $-1,5 < dCq \leq -0,5$, dilua a amostra oito vezes
- ▶ $-0,5 < dCq \leq 0,5$, dilua a amostra quatro vezes
- ▶ $0,5 < dCq \leq 1,5$, dilua a amostra duas vezes
- ▶ $1,5 < dCq \leq 4$, use amostra não diluída
- ▶ $dCq > 4$, não use amostra

PONTO DE INTERRUÇÃO SEGURO

Os valores dCq são válidos por 28 dias se as amostras de DNA forem armazenadas de 2 °C a 8 °C; eles serão válidos por 161 dias se as amostras de DNA forem armazenadas de -25 °C a -15 °C.

Procedimentos de controle de qualidade

- Um DNA de controle de qualidade e um controle negativo (sem modelo) estão incluídos em cada execução de qPCR de qualificação. O modelo de DNA de controle de qualidade é usado para normalizar os dados de qPCR.
- Depois da última etapa, o instrumento de qPCR analisa as amostras quantificadas. Se a amplificação do NTC ocorrer dentro de 10 ciclos da amplificação de DNA de controle de qualidade, é possível que haja contaminação das amostras e o teste deverá ser repetido.
- Garanta que o DNA de controle de qualidade produza as curvas de amplificação esperadas. Amplifique o DNA de controle de qualidade a um Cq de aproximadamente 15 a 22 ciclos. Exclua as réplicas de um grupo triplicado que seja $> 0,5$ Cq diferente do restante do grupo.
- Exclua as réplicas que exibam curvas anormais de amplificação. Pelo menos duas das três réplicas devem ser incluídas no cálculo final para uma amostra individual ou o processo de qualificação deverá ser repetido para essas amostras.
- Se quatro ou mais amostras por execução de 10 amostras tiverem réplicas removidas, repita o processo de qualificação de todas as amostras.

Características de desempenho

A **Tabela 4** apresenta os valores Cq de gDNA a 0,25 ng/μl de cinco fornecedores comerciais (B, C, P, R e T) ou extraídos de uma amostra de sangue total. O material de referência do NIST com a mesma concentração é mostrado para comparação. Os valores Cq são de três operadores independentes e de três plataformas independentes de qPCR (A, B, S). Os resultados mostram a média \pm o desvio padrão. O instrumento B mostra um aumento consistente de Cq em relação aos instrumentos A e S; as amostras normalizadas pelo DNA de controle de qualidade apresentaram valores consistentes de dCq em todos os instrumentos (dados não mostrados).

Tabela 4 Valores de Cq do DNA de controle de qualidade adquirido de fornecedores ou extraído do sangue

Instrumento de qPCR	NIST masculino 2372	Fornecedor B	Fornecedor C	Fornecedor P	Fornecedor R	Fornecedor T	Extraído
Instrumento A	18,87 +/- 0,07	19,14 +/- 0,14	18,79 +/- 0,13	19,11 +/- 0,17	19,07 +/- 0,12	19,03 +/- 0,17	18,78 +/- 0,07
Instrumento B	20,47 +/- 0,09	20,75 +/- 0,12	20,43 +/- 0,12	20,71 +/- 0,19	20,71 +/- 0,06	20,69 +/- 0,15	20,46 +/- 0,09
Instrumento S	19,06 +/- 0,10	19,39 +/- 0,13	18,99 +/- 0,14	19,29 +/- 0,16	19,31 +/- 0,10	19,24 +/- 0,15	19,08 +/- 0,16

Patentes e marcas comerciais

Este documento e seu conteúdo são propriedade da Illumina, Inc. e de suas afiliadas (“Illumina”), e destinam-se exclusivamente ao uso contratual de seu cliente com relação ao uso dos produtos descritos neste documento e para nenhuma outra finalidade. Este documento e seu conteúdo não devem ser usados ou distribuídos para nenhuma outra finalidade, nem comunicados, divulgados ou reproduzidos de nenhuma forma sem o consentimento prévio por escrito da Illumina. A Illumina não concede nenhuma licença sob seus direitos de patente, marca registrada, direitos autorais ou lei comum, nem direitos semelhantes de terceiros por meio deste documento.

As instruções neste documento devem ser estrita e explicitamente seguidas por pessoal devidamente treinado e qualificado para garantir o uso adequado e seguro dos produtos descritos neste documento. Todo o conteúdo deste documento deve ser inteiramente lido e entendido antes da utilização de tais produtos.

NÃO LER COMPLETAMENTE E NÃO SEGUIR EXPLICITAMENTE TODAS AS INSTRUÇÕES AQUI CONTIDAS PODE RESULTAR EM DANOS AO(S) PRODUTO(S), FERIMENTOS A PESSOAS, INCLUSIVE USUÁRIOS OU OUTROS, E DANOS A OUTROS BENS, ANULANDO TODA GARANTIA APLICÁVEL AO(S) PRODUTO(S).

A ILLUMINA NÃO SE RESPONSABILIZA POR QUALQUER PROBLEMA CAUSADO PELO USO INDEVIDO DO(S) PRODUTO(S) MENCIONADO(S) ACIMA (INCLUINDO PARTES SEPARADAS OU SOFTWARE).

© 2019 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

AMPure, Beckman e Beckman Coulter são marcas comerciais ou marcas comerciais registradas da Beckman Coulter, Inc.

Informações de contato



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Califórnia 92122, EUA

+1 (800) 809-ILMN (4566)

+1 (858) 202-4566 (fora da América do Norte)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Cambridge Limited

Chesterford Research Park, Little Chesterford

Saffron Walden, CB10 1XL

REINO UNIDO

Emergo Europe

Molenstraat 15

2513 BH Haia

Países Baixos

Patrocinador australiano

Illumina Australia Pty Ltd

1 International Court

Scoresby, Victoria, 3179

Austrália

Rótulos do produto

Para obter uma referência completa aos símbolos que possam ser exibidos na embalagem e nos rótulos do produto, consulte a chave de símbolos em support.illumina.com na guia *Documentation and Literature* (Documentação e literatura) de seu kit.