

Instruções de Utilização



LymphoTrack[®] Dx TRG Assay – MiSeq™

Para identificar e localizar rearranjos génicos do recetor gama de células T (TRG) utilizando Sequenciação de Nova Geração (NGS) com o sistema Illumina[®] MiSeq.

IVD Este ensaio destina-se a diagnóstico *in vitro*.

Representação esquemática do locus do gene TRG:



 Condições de armazenamento: **-85°C a -65°C**
(Os controlos de ADN podem ser separados dos kits de ensaio e armazenados a uma temperatura entre 2°C e 8°C)

Ref. Catálogo	Produtos	Quantidade
REF 92270019	LymphoTrack Dx TRG Assay Kit A – MiSeq	8 índices – 5 reações cada
REF 92270009	LymphoTrack Dx TRG Assay Panel – MiSeq	24 índices – 5 reações cada

Índice

1.	UTILIZAÇÃO PRETENDIDA	3
2.	RESUMO E EXPLICAÇÃO DO ENSAIO.....	3
2.1.	Contextualização	3
2.2.	Resumo.....	3
3.	PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO	4
3.1.	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	4
3.2.	Purificação de Amplicons	4
3.3.	Quantificação de Amplicons.....	4
3.4.	Sequenciação de Nova Geração (NGS)	4
3.5.	Multiplexação de Amplicons	5
4.	REAGENTES	6
4.1.	Componentes dos Reagentes	6
4.2.	Advertências e Precauções.....	7
4.3.	Armazenamento e Manuseamento.....	7
5.	EQUIPAMENTOS.....	8
5.1.	Termociclador.....	8
5.2.	Suporte Magnético.....	8
5.3.	Instrumento de PCR em Tempo Real.....	8
5.4.	Equipamento Illumina MiSeq*	8
6.	RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS	9
6.1.	Precauções	9
6.2.	Substâncias Interferentes.....	9
6.3.	Requisitos e Manuseamento de Amostras	9
6.4.	Armazenamento de Amostras.....	9
7.	PROCEDIMENTO DE ENSAIO	10
7.1.	Materiais Fornecidos.....	10
7.2.	Materiais Necessários (não fornecidos)	10
7.3.	Preparação de Reagentes.....	11
7.4.	Amplificação.....	11
7.5.	Purificação com AMPure XP	12
7.6.	Quantificação de Amplicons.....	13
7.7.	Agrupamento e Quantificação da Biblioteca	14
7.8.	Diluição da Biblioteca Agrupada.....	14
7.9.	Preparar qPCR para Library Quantification (Quantificação de Biblioteca)	14
7.10.	Preparação da Biblioteca para a Análise de Sequenciação MiSeq	15
7.11.	Carregamento da MiSeq Flow Cell (Lâmina de fluxo MiSeq).....	16
7.12.	Configuração da MiSeq Sample Sheet (Folha de amostras MiSeq)	16
7.13.	Início da Análise MiSeq.....	17
8.	ANÁLISE DE DADOS	17
9.	VALORES ESPERADOS	18
10.	LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	18
11.	INTERPRETAÇÃO E RELATÓRIO	19
12.	DADOS DE AMOSTRAS.....	21
13.	CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	21
14.	GUIA DE RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	22
15.	SERVIÇOS TÉCNICOS E APOIO AO CLIENTE	23
16.	BIBLIOGRAFIA	23
17.	SÍMBOLOS.....	23
18.	AVISO LEGAL	24
19.	LYMPHOTRACK Dx TRG ASSAY - MiSEQ: GUIA DE PÁGINA ÚNICA	25
20.	ANEXO A: CRIAR UMA BIBLIOTECA DE SEQUENCIAÇÃO COM MÚLTIPLOS ALVOS NGS	26

1. Utilização Pretendida

O Ensaio LymphoTrack Dx *TRG* para o sistema Illumina MiSeq é um produto de diagnóstico *in vitro* para a determinação da frequência de distribuição, baseada em sequenciação de nova geração (NGS), dos rearranjos génicos de *TRG* em doentes com suspeita de doença linfoproliferativa. Este ensaio é um auxiliar na identificação de doenças linfoproliferativas.

2. Resumo e Explicação do Ensaio

2.1. Contextualização

O locus do gene do recetor gama de células T humanas (*TRG*, anteriormente conhecido como *TCRG*) no cromossoma 7 (7q14) inclui 14 genes V γ (região variável) (Grupos I, II, III e IV), 5 segmentos génicos J γ (região de junção) e 2 genes C γ (região constante) distribuídos por mais de 200 quilobases.

As células linfoides são diferentes das outras células somáticas no corpo. Durante o desenvolvimento, os genes de recetores antigénicos nas células linfoides sofrem rearranjos génicos somáticos.¹ Por exemplo, durante o desenvolvimento da célula T, os genes que codificam as moléculas do TRG são constituídos a partir de múltiplos segmentos de genes polimórficos que sofrem rearranjos e seleção, gerando combinações V γ –J γ que são únicas, em termos de comprimento e sequência. Uma vez que as leucemias e os linfomas têm origem em transformações malignas de células linfoides individuais, as células leucémicas ou de linfoma de um indivíduo partilham geralmente um ou mais rearranjos génicos de recetores antigénicos específicos de células ou “clonais”. Por conseguinte, os testes que detetam rearranjos clonais de TRG podem ser úteis no estudo das neoplasias de células B e T.

Inicialmente, os rearranjos clonais eram identificados através da utilização das técnicas de Fragmentos de Restrição e Hibridação de Southern Blot (RF-SBH). No entanto, estes testes mostraram ser complexos e morosos, requeriam grandes quantidades de ADN e não eram adequados para analisar muitos dos loci de recetores antigénicos menos diversos.

Durante as últimas décadas, a utilização de ensaios de RF-SBH tem sido substituída por testes de clonalidade baseados em PCR, desenvolvidos por Alexander Morley² que são atualmente considerados o método padrão por excelência. Estes ensaios identificam a clonalidade com base na sobre-representação de produtos V-D-J amplificados (ou produtos D-J incompletos) após a sua separação através de eletroforese em gel ou capilar. Embora sensíveis e adequados para testar pequenas quantidades de ADN, estes ensaios não conseguem distinguir facilmente populações clonais e rearranjos múltiplos que poderão estar ocultos por um pico de tamanho único, e também não são concebidos para identificar a sequência específica de ADN V-J que é necessária para localizar populações clonais em análises subsequentes. Esta segunda limitação pode ter uma importância particular, visto que uma vez identificada a sequência única de ADN específica para o clone, esta pode ser utilizada em análises subsequentes para localizar e monitorizar as populações clonais de células.

2.2. Resumo

Este LymphoTrack Dx *TRG* Assay – MiSeq representa uma melhoria significativa em relação aos ensaios de clonalidade existentes que utilizam a análise de fragmentos, uma vez que deteta de forma eficiente a maioria dos rearranjos génicos de *TRG* utilizando uma multiplex master mix individual e, ao mesmo tempo, identifica a sequência de ADN específica para cada rearranjo génico clonal. Este ensaio tem assim duas aplicações importantes e complementares, é um auxiliar na deteção de populações clonais iniciais e identifica informações de sequências necessárias para localizar esses clones em amostras subsequentes.

Cada multiplex master mix individual para *TRG* visa as regiões conservadas nos segmentos V γ e J γ descritas nas neoplasias linfoides. Os primers incluídos nas master mixes são concebidos com os adaptadores da Illumina e até 24 índices diferentes. Este método permite uma reação de PCR em uma etapa e o agrupamento de amplicons de várias amostras e alvos diferentes (gerados com outros Ensaios LymphoTrack Dx para o equipamento Illumina MiSeq, vendidos separadamente) numa MiSeq flow cell (lâmina de fluxo MiSeq), permitindo a análise de até 24 amostras por alvo em paralelo, numa única análise.

O LymphoTrack Dx Software – MiSeq associado disponibiliza um método de análise e visualização de dados simples e dinâmico. Seguindo as orientações apresentadas na secção 11: *Interpretação e Relatório*, os resultados da amostra resumidos no software podem ser facilmente interpretados quanto à presença ou ausência de clonalidade.

Os resultados dos testes de clonalidade molecular devem ser sempre interpretados no contexto de dados clínicos, histológicos e imunofenotípicos.

Os controlos positivos e negativos para a clonalidade estão incluídos no kit.

Nota: Para uma explicação mais completa sobre o locus e a estratégia de sequenciação direcionada, consulte Miller J.E., 2013.³

3. Princípios do Procedimento

3.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os ensaios de PCR são habitualmente utilizados para a identificação de populações clonais de células B e T. Estes ensaios amplificam o ADN entre primers direcionados para as regiões conservadas V e J dos genes de recetores antigénicos. Estes primers são direcionados para as regiões conservadas e encontram-se em ambos os lados de uma área onde ocorrem rearranjos genéticos programados durante a maturação de todos os linfócitos B e T. É a partir destes rearranjos genéticos que são originadas diferentes populações de linfócitos B e T.

Os genes de recetores antigénicos que sofrem rearranjos constituem os loci das cadeias pesadas (*IGH*) e das cadeias leves (*IGK* e *IGL*) das imunoglobulinas nas células B, e os loci do gene do recetor das células T (*TRA*, *TRB*, *TRG* e *TRD*) nas células T. Cada célula B e T contém um ou dois rearranjos V-J produtivos com um comprimento e sequência únicos. Portanto, quando o ADN de uma população normal ou policlonal é amplificado utilizando primers de ADN que flanqueiam a região V-J, são gerados amplicons com uma sequência e comprimentos únicos, refletindo a população heterogénea. Em alguns casos, nos quais não está presente ADN linfocitário, não serão gerados amplicons. As amostras que contêm populações clonais de *TRG* originam um ou dois produtos principais amplificados com o mesmo comprimento e sequência, que são detetados com uma frequência significativa num contexto policlonal diminuído.

3.2. Purificação de Amplicons

Os amplicons de PCR são purificados para remover primers em excesso, nucleótidos, sais e enzimas utilizando tecnologia de esferas paramagnéticas para a imobilização reversível em fase sólida (SPRI) para purificação de alto rendimento de amplicons de PCR. Utilizando um tampão otimizado, os produtos de PCR com um comprimento de 100 pares de bases ou superior ligam-se seletivamente às esferas paramagnéticas, enquanto que contaminantes como primers em excesso, dímeros de primers, sais e dNTPs não incorporados são removidos. Os amplicons podem então ser eluídos e separados das esferas paramagnéticas, resultando num produto de PCR mais purificado para subsequente análise e quantificação de amplicons.

3.3. Quantificação de Amplicons

Os amplicons purificados são quantificados utilizando os Kits KAPA™ Library Quantification (Quantificação de biblioteca KAPA™) para plataformas Illumina. Amplicons de PCR purificados e diluídos e um conjunto de seis padrões de ADN pré-diluídos são amplificados através de métodos quantitativos (qPCR), utilizando master mix e primers KAPA SYBR® FAST qPCR. Os primers no kit KAPA têm como alvo as sequências de oligonucleotídeos do adaptador de lâmina de fluxo Illumina P5 e P7.

A pontuação Ct média para os padrões de ADN pré-diluídos é representada em gráfico contra o log10 para gerar uma curva padrão, que pode ser utilizada para calcular a concentração (pM) dos amplicons de PCR derivados do ADN da amostra. Calcular a concentração de amplicons de PCR permite uma igual representação de amplicons na biblioteca final agrupada que é carregada no MiSeq para sequenciação.

3.4. Sequenciação de Nova Geração (NGS)

Os métodos de sequenciação de Sanger são os mais populares entre uma variedade de tecnologias de sequenciação de ácidos nucleicos de “primeira geração”. Métodos mais recentes, que utilizam abordagens de sequenciação massiva paralela, são muitas vezes referidos como Sequenciação de Nova Geração (NGS). Estas tecnologias podem utilizar várias estratégias de combinação para a preparação do molde, sequenciação, imagiologia e bioinformática para o alinhamento e montagem de genomas.

As tecnologias NGS utilizadas neste ensaio recorrem à amplificação de sequências genéticas, através de uma série de primers de consenso forward e reverse que inclui adaptadores e marcadores de índice. Os amplicons gerados com as LymphoTrack Dx Master Mixes são quantificados, agrupados e carregados numa lâmina de fluxo para sequenciação numa plataforma de sequenciação Illumina MiSeq. Especificamente, os produtos amplificados na biblioteca são

hibridados para oligonucleotídeos numa lâmina de fluxo e amplificados para formar colónias clonais locais (amplificação em ponte). São adicionados quatro tipos de bases de terminador reversível (bases RT) e o vetor de sequenciação do ADN é alargado um nucleótido de cada vez. Para registar a incorporação de nucleótidos, a câmara CCD capta uma imagem da luz emitida à medida que cada base RT é adicionada e, em seguida, clivada para permitir a incorporação da base seguinte.

3.5. Multiplexação de Amplicons

Este ensaio foi concebido para permitir dois níveis diferentes de multiplexação a fim de reduzir os custos e o tempo necessários para os laboratórios. O primeiro nível de multiplexação tem origem nos vários índices que são fornecidos com os ensaios. Cada um destes 24 índices atua como um código de barras único que permite que os amplicons de amostras individuais sejam agrupados após a amplificação por PCR para gerar a biblioteca de sequenciação; as sequências resultantes são ordenadas pelo software de bioinformática que identifica as sequências que originaram de uma amostra individual.

O segundo nível de multiplexação tem origem na capacidade do software incluído ordenar dados de sequenciação por índice e alvo. Isto permite que os amplicons gerados com primers direcionados (mesmo os marcados com o mesmo índice) sejam agrupados para gerar a biblioteca e sequenciados numa lâmina de fluxo único. Um exemplo seria sequenciar uma combinação de produtos de vários Kits de Ensaio Invivoscribe LymphoTrack Dx para o MiSeq, tais como Líder *IGHV*, *IGH FR1*, *IGH FR2*, *IGH FR3*, *IGK*, *TRB* e *TRG*. **Na multiplexação de amplicons de diferentes alvos génicos, é importante utilizar a química de sequenciação adequada. O número de ciclos de sequenciação deve ser suficiente para sequenciar o maior amplicon no multiplex.** Por exemplo, na multiplexação de uma combinação de amplicons *IGH FR1*, *IGH FR2*, *IGH FR3*, *IGK*, *TRB* e *TRG*, utilize o kit de sequenciação MiSeq v2 (500 ciclos) para, no máximo, 4 alvos ou o kit de sequenciação v3 (600 ciclos) para, no máximo, 7 alvos. Na multiplexação conjunta de qualquer um destes amplicons com o Líder *IGHV*, utilize o kit de sequenciação MiSeq v3 (600 ciclos). No caso de uma multiplexação apenas com os amplicons *IGH FR3* e *TRG*, uma vez que ambos têm tamanhos de amplicons mais reduzidos, utilize os kits de sequenciação MiSeq v2 (300 ou 500 ciclos) e ajuste as definições do ciclo na folha de amostras. Para instruções adicionais, consulte o Anexo A (secção 20).

O número de amostras que podem ser utilizadas na multiplexação numa lâmina de fluxo único depende também da lâmina de fluxo utilizada. As lâminas de fluxo padrão da Illumina (MiSeq v3) são capazes de gerar entre 22 - 25 milhões de leituras. Para determinar o número de leituras por amostra, divida o número total de leituras para a lâmina de fluxo pelo número de amostras que serão utilizadas na multiplexação e o número de leituras por amostra será suficiente para uma interpretação válida. Para obter mais informações, consulte a secção 11 *Interpretação e Relatório*. A Illumina também fabrica outras lâminas de fluxo que utilizam a mesma química de sequenciação, mas geram menos leituras. **Ao utilizar estas lâminas de fluxo alternativas, deve ter-se em consideração que um número total de leituras mais reduzido significa uma menor extensão (depth) por amostra ou que serão analisadas menos amostras na lâmina de fluxo para alcançar a mesma extensão (depth) por amostra.**

4. Reagentes

4.1. Componentes dos Reagentes

Tabela 1. Kits Disponíveis

Ref. Catálogo	Descrição	Número de Master Mixes Indexadas	Total de Reações
 92270019	LymphoTrack Dx TRG Assay Kit A – MiSeq	8 índices – 5 análises de sequenciação cada	40
 92270009	LymphoTrack Dx TRG Assay Panel – MiSeq	24 índices – 5 análises de sequenciação cada	120

Tabela 2. Componentes dos Kits

Reagente	Componentes dos Reagentes	Quantidade Unitária	92270019 Número de Unidades	92270009 Número de Unidades	Temperatura de Armazenamento	Notas
Master Mixes [‡]	TRG MiSeq 01	225 µL	1	1		N/A
	TRG MiSeq 02		1	1		
	TRG MiSeq 03		1	1		
	TRG MiSeq 04		1	1		
	TRG MiSeq 05		1	1		
	TRG MiSeq 06		1	1		
	TRG MiSeq 07		1	1		
	TRG MiSeq 08		1	1		
	TRG MiSeq 09		0	1		
	TRG MiSeq 10		0	1		
	TRG MiSeq 11		0	1		
	TRG MiSeq 12		0	1		
	TRG MiSeq 13		0	1		
	TRG MiSeq 14		0	1		
	TRG MiSeq 15		0	1		
	TRG MiSeq 16		0	1		
	TRG MiSeq 18		0	1		
	TRG MiSeq 19		0	1		
	TRG MiSeq 20		0	1		
	TRG MiSeq 21		0	1		
	TRG MiSeq 22		0	1		
	TRG MiSeq 23		0	1		
	TRG MiSeq 25		0	1		
	TRG MiSeq 27		0	1		
ADN de Controlo Positivo	TRG POS (+)  42270019)	45 µL	1	3		Vγ11/ Jγ1/2 ADN diluído em ADN de amígdala faríngea
ADN de Controlo Negativo	NGS NEG (-)  40920018)	45 µL	1	3	ou 	ADN de amígdala faríngea, a frequência de sequência mais elevada pode variar entre lotes

Nota: Não são utilizados conservantes no fabrico destes kits.

***Nota:** Os índices 17, 24 e 26 não são utilizados nestes kits

4.2. Advertências e Precauções



Leia atentamente as Instruções de Utilização antes de iniciar o procedimento de ensaio e siga rigorosamente cada passo.

- **IVD** Este produto destina-se a diagnóstico *in vitro*.
- O kit de ensaio deve ser utilizado como um sistema. Não substitua os reagentes com os de outros fabricantes. A diluição, redução das reações de amplificação ou outros desvios deste protocolo podem afetar o desempenho desta análise e/ou anular qualquer sublicença limitada que acompanha a compra destes kits.
- Os materiais são estáveis até à data de validade indicada no rótulo, quando armazenados e manuseados como indicado. Não utilize os kits após a sua data de validade.
- O cumprimento do protocolo na íntegra irá garantir um desempenho e reprodutibilidade ótimos. Certifique-se de que são usados os programas corretos do termociclador, uma vez que outros programas poderão fornecer dados imprecisos/erróneos, tais como resultados falsos positivos e falsos negativos.
- Não misture nem combine reagentes de kits com diferentes números de lote.
- Elimine os reagentes não usados e os resíduos de acordo com os regulamentos nacionais, federais, estaduais e locais.
- Todos os procedimentos laboratoriais devem ser realizados com equipamento de proteção individual padrão (luvas, batas de laboratório e proteção ocular). Siga as boas práticas laboratoriais e precauções universais ao trabalhar com amostras. Não pipete com a boca. Não coma, beba ou fume nas áreas de trabalho do laboratório. Lave bem as mãos após manusear as amostras e os reagentes dos ensaios. As amostras devem ser manuseadas em instalações de contenção de segurança biológica aprovadas e só devem ser abertas em câmaras de segurança biológica certificadas.
- É recomendada a utilização de água para biologia molecular para a preparação do ADN de amostra.
- Devido à elevada sensibilidade analítica desta análise, deve ser tomado extremo cuidado para evitar qualquer contaminação dos reagentes ou misturas de amplificação com amostras, controlos ou materiais amplificados. Use pontas de pipeta novas e resistentes a aerossóis para cada amostra e cada reagente. Todos os reagentes devem ser cuidadosamente controlados quanto a sinais de contaminação (*p. ex.*, controlos negativos que originam sinais positivos). Elimine quaisquer reagentes suspeitos de contaminação.
- Para minimizar a contaminação, utilize luvas limpas ao manusear amostras e reagentes e limpe regularmente as áreas de trabalho e as pipetas antes de preparar a PCR.
- O fluxo de trabalho no laboratório de PCR deve ser unidirecional entre as áreas de trabalho separadas: começando pela preparação da master mix, passando para a preparação das amostras e, em seguida, para a amplificação e, finalmente, para a deteção. A autoclavagem não elimina a contaminação de ADN. Não leve ADN amplificado para áreas designadas para master mixes ou para a preparação das amostras.
- Todas as pipetas, pontas de pipeta e equipamentos utilizados numa determinada área devem ser exclusivos dessa área do laboratório.
- Os artigos não descartáveis devem ser descontaminados com lixívia a 10% e enxaguados com água destilada duas vezes antes de os devolver às áreas iniciais.
- Sempre que possível, deve ser utilizado material plástico estéril e descartável, para evitar a contaminação.

4.3. Armazenamento e Manuseamento

- Se o ensaio não for utilizado de imediato, armazene a uma temperatura entre -85°C e -65°C.
- A temperatura de armazenamento ótima para os controlos de ADN é entre 2°C a 8°C, mas o ADN também pode ser armazenado entre -85°C e -65°C.
- Todos os reagentes e controlos devem ser descongelados e misturados em vórtex, ou completamente misturados, antes da utilização de forma a assegurar que estão completamente ressuspensos.
- Devido a elevadas concentrações de sal, as master mixes de PCR são sensíveis aos ciclos de congelamento/descongelamento. O número de ciclos deve ser limitado a um máximo de quatro.

Em caso de dúvidas, entre em contacto com a equipa técnica da Invivoscribe. Teremos todo o gosto em ajudá-lo a determinar as suas necessidades de armazenamento ótimo.

5. Equipamentos

Os equipamentos específicos abaixo indicados são recomendados com base nos métodos utilizados para validar este ensaio.

5.1. Termociclador

- Utilização ou função: Amplificação de amostras de ADN
- Equipamento sugerido: Thermal Cycler Veriti™ Dx (Termociclador Veriti™ Dx) ou equivalente
- Características de desempenho e especificações:
 - Gama térmica mínima: 15 °C a 96 °C
 - Velocidade de rampa mínima: 0,8 °C/seg
- Siga os procedimentos de instalação, funcionamento, calibração e manutenção do fabricante.
- Consulte a secção 7.4 *Amplificação* para informações sobre o programa do termociclador.

5.2. Suporte Magnético

- Utilização ou função: Purificação de produtos de PCR
- Equipamento sugerido:
 - Magnetic Stand 96* (Suporte magnético 96*) da Ambion® (REF AM10027)
 - 96 Ring Super Magnet Plate* (Placa magnética 96 Ring Super*) da Agencourt SPRIPlate® (REF A32782)
 - DynaMag™-96 Side Skirted Magnet* (Magneto com rebordo 96 DynaMag™*) da Thermo Fisher Scientific (REF 12027)
- Características de desempenho e especificações:
 - Esferas paramagnéticas de precipitado
- Consulte a secção 7.5 *Purificação AMPure XP* para informações sobre métodos de purificação de produtos de PCR.

5.3. Instrumento de PCR em Tempo Real

- Utilização ou função: Quantificação de produtos de PCR purificados
- Equipamento sugerido: Real-Time PCR Instrument Fast Dx (Instrumento de PCR em tempo real Fast Dx) da Applied Biosystems® 7500 ou equivalente
- Características de desempenho e especificações:
 - Capaz de detetar o comprimento de onda do SYBR Green
- Siga os procedimentos de instalação, funcionamento, calibração e manutenção do fabricante.
- Consulte a secção 7.6 *Quantificação de Amplicons* para informações sobre o programa de PCR em tempo real.

5.4. Equipamento Illumina MiSeq*

- Utilização ou função: Sequenciação da biblioteca de ADN normalizado
- Características de desempenho e especificações:
 - Compatível com o MiSeq Reagent Kit v2 (kit de reagente MiSeq v2)*
 - Compatível com o MiSeq Reagent Kit v3 (kit de reagente MiSeq v3)* para multiplexação
- Siga os procedimentos de instalação, funcionamento, calibração e manutenção do fabricante
- Consulte as secções 7.11 *Carregamento da MiSeq Flow Cell (Lâmina de fluxo MiSeq)*, 7.12 *Configuração da MiSeq Sample Sheet (Folha de amostras MiSeq)* e 7.13 *Início da Análise MiSeq* para informações sobre os parâmetros MiSeq.

*Aviso: Estes produtos não possuem a marcação CE

6. Recolha e Preparação de Amostras

6.1. Precauções

As amostras biológicas de seres humanos podem conter materiais potencialmente infecciosos. Todas as amostras devem ser manuseadas de acordo com o programa de Agentes Patogénicos Transmitidos pelo Sangue do seu instituto e/ou de acordo com o Nível 2 de Biossegurança.

6.2. Substâncias Interferentes

As seguintes substâncias são conhecidas por interferir com a PCR:

- Quelantes de catiões divalentes
- Pontas de pipeta de baixa retenção
- EDTA (não significativo em baixas concentrações)
- Heparina

6.3. Requisitos e Manuseamento de Amostras

- A quantidade de análise mínima é de 50 ng de ADN de alta qualidade (5 µL de ADN de amostra numa concentração mínima de 10 ng/µL).
- Este ensaio testa ADN genómico extraído e purificado. O ADN deve ser quantificado com um método específico para ADN de cadeia dupla (dsDNA) e livre de inibidores de PCR.
- Deve ressuspender o ADN numa solução apropriada, tal como tampão TE 0,1X (Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0, preparado com água para biologia molecular), ou apenas água para biologia molecular.

6.4. Armazenamento de Amostras

As amostras devem ser armazenadas utilizando um método que previna a degradação de ADN.

7. Procedimento de Ensaio

7.1. Materiais Fornecidos

Consulte a Tabela 2 para informações sobre os materiais fornecidos.

7.2. Materiais Necessários (não fornecidos)

Tabela 3. Materiais Necessários (não fornecidos)

Reagente/Material	Reagentes Necessários ou Recomendados/Fornecedores	Ref. Catálogo	Notas
ADN polimerase	Roche: - EagleTaq™ DNA Polymerase (ADN EagleTaq™ polimerase) ou Invivoscribe: - FalconTaq DNA Polymerase ou equivalente	05206944190 ou 60970130	5 U/μL
Água para biologia molecular	N/A	N/A	Sem ADNase/ARNase
Pipetas calibradas	N/A	N/A	Devem ser capazes de medir com precisão volumes entre 0,2 μL e 1000 μL
Placas ou tubos de PCR	N/A	N/A	Sem ADNase/ARNase/Inibidores de PCR
Pontas de pipeta com filtro	N/A	N/A	Esterilizadas, sem ARNase/ADNase/pirogénios
Tubos de microcentrifugadora	N/A	N/A	Esterilizados
Kit de Purificação de PCR	Beckman Coulter, Inc: Agencourt AMPure XP	A63880	N/A
Purificação de PCR	Thermo Fisher Scientific: - Magnetic Stand 96 (Suporte magnético 96) da Ambion - DynaMag-96 Side Skirted Magnet (Magneto com rebordo 96 DynaMag) ou Beckman Coulter: 96 Ring Super Magnet Plate (Placa magnética 96 Ring Super) da Agencourt SPRIPlate ou equivalente	AM10027 12027 ou A32782	N/A
Quantificação de amplicons e biblioteca	KAPA Biosystems: Kit KAPA Library Quantification (Quantificação de biblioteca KAPA) – Illumina	KK4824	N/A
Análise MiSeq	Illumina: - MiSeq Reagent v2 kit (Kit de reagente MiSeq v2) (300 ciclos) ou - v2 kit (Kit v2) (500 ciclos) ou - v3 kit (Kit v3) (600 ciclos) para multiplexação	MS-102-2002 ou MS-102-2003 ou MS-102-3003	Lâmina de fluxo padrão
Software MiSeq	- MiSeq Software Control (Software de controlo MiSeq) v2.6 ou versão mais recente - Local Run Manager v2.0 ou versão mais recente	N/A	N/A
Tampão de diluição A	N/A	N/A	Preparar uma solução de 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 + 0,05% solução Tween 20

7.3. Preparação de Reagentes

Para garantir que as amostras de ADN não contêm inibidores de PCR e têm uma qualidade e quantidade suficientes para gerar um resultado válido, podem ser analisadas com a Specimen Control Size Ladder Master Mix (Master Mix da Escala de Tamanhos de Controlo de Amostras) da Invivoscribe ([REF](#) 20960021 para deteção ABI ou [REF](#) 20960020 para deteção em gel). A Specimen Control Size Ladder (Escala de Tamanhos de Controlo de Amostras) visa vários genes e gera uma série de amplicons com 100, 200, 300, 400 e 600 pb; o tamanho pode variar +/- 5 pb devido ao padrão de tamanho e/ou diferenças de instrumentos. A verificação da integridade do DNA é especialmente importante para amostras desafiadoras, *p.ex.*, tecidos fixados em formalina e incorporados em parafina (FFPE).

Utilize sempre controlos positivos e negativos para garantir que o ensaio foi realizado corretamente.

Configure sempre um controlo sem molde (NTC) para verificar a contaminação durante o processo de preparação da PCR.

- 7.3.1. Com as mãos protegidas com luvas, retire as Master Mixes do congelador. Deixe os tubos descongelar e, em seguida, misture-os cuidadosamente em vórtex e centrifugue-os brevemente.
- 7.3.2. Numa câmara de fluxo laminar ou câmara isolada, pipete 45 µL de cada tubo de Master Mix para uma placa de PCR limpa (um poço para cada Master Mix e uma Master Mix por amostra).
 - Cada análise deve incluir dois controlos (um positivo e um negativo) e um NTC.
 - Para o NTC, utilize água para biologia molecular como molde, em vez de ADN.
- 7.3.3. Adicione 0,2 µL de ADN Taq polimerase (a 5 U/µL) a cada poço contendo Master Mixes aliquotadas.
- 7.3.4. Adicione 5 µL de ADN de amostra (numa concentração mínima de 10 ng/µL), ADN de controlo ou água para biologia molecular (NTC) aos poços individuais contendo as reações de Master Mix respetivas.
 - Pipete para cima e para baixo 5 a 10 vezes para misturar.
 - Sele a placa e coloque-a no termociclador de PCR.

Tabela 4. Preparação da Reação

Reagente	Volume
Master Mix	45,0 µL
ADN Taq polimerase	0,2 µL
ADN de Amostra ou Controlo	5,0 µL
Volume Total	50,2 µL

7.4. Amplificação

- 7.4.1. Amplifique as amostras utilizando o programa de PCR da Tabela 5.

No caso de multiplexação de vários alvos, consulte o Anexo A (secção 20) para outras condições do termociclador com o LymphoTrack Dx Assay - MiSeq.

Tabela 5. Programa de PCR

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclo
1	95 °C	7 minutos	1
2	95 °C	45 segundos	29x
3	60 °C	45 segundos	
4	72 °C	90 segundos	
5	72 °C	10 minutos	1
6	15 °C	∞	1

Nota: Defina a tampa aquecida para **105 °C** e o volume de reação para **50 µL**

- 7.4.2. Retire a placa de PCR do termociclador uma vez concluído o programa de amplificação. Se não prosseguir imediatamente para as próximas etapas, guarde os produtos de PCR a 4 °C durante 1 dia.

7.5. Purificação com AMPure XP

A purificação de produtos de PCR das amostras, controlos positivos e negativos e controlos sem molde, foi feita utilizando o sistema PCR Purification (Purificação de PCR) Agencourt AMPure XP.

Preparação:

- 7.5.1. Retire o reagente AMPure XP do local de armazenamento e deixe-o equilibrar à temperatura ambiente antes de ser utilizado. Agite suavemente o frasco de Agencourt AMPure XP para ressuspender quaisquer partículas magnéticas que possam ter assentado.

Consulte o Anexo A (secção 20) para obter informações sobre os volumes de reagente AMPure XP utilizados noutros produtos de PCR do LymphoTrack Dx Assay - MiSeq.

- 7.5.2. Transfira o volume apropriado de reagente Agencourt AMPure XP necessário para a placa para um novo tubo de 2 mL, de forma a minimizar o risco de contaminação por pontas de pipeta.
- O volume necessário de reagente Agencourt AMPure XP = $n \times 50 \mu\text{L}$ (n é o número de amostras a purificar).
- 7.5.3. Prepare um novo lote (0,5 mL para cada amostra a ser purificada) de etanol a 80%, utilizando água estéril.

Ligação de Amplicons a Partículas Magnéticas:

- 7.5.4. Adicione 50 μL de reagente Agencourt AMPure XP aliquoteado, à temperatura ambiente a cada amostra a ser purificada.
- Misture pipetando para cima e para baixo 10 vezes.
 - A cor da mistura deve aparecer homogénea após a mistura.
 - Incube durante 10 minutos à temperatura ambiente.
- 7.5.5. Coloque as amostras misturadas num DynaMag-96 Side Skirted (Magneto com rebordo 96 DynaMag) ou num Magnetic Stand-96 (Suporte magnético 96) da Ambion e incube-as à temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir que as partículas magnéticas se separem da solução.
- Mantenha sempre a placa no suporte magnético durante este procedimento, até à etapa 7.5.10 a seguir.
- 7.5.6. Utilizando uma pipeta P200 (ou pipeta multicanal equivalente) calibrada para 95 μL , aspire o sobrenadante limpo e elimine-o.
- Utilize uma pipeta P10 (ou pipeta multicanal equivalente) calibrada para 10 μL para remover qualquer sobrenadante em excesso.
 - Evite remover quaisquer partículas magnéticas.

Lavagem:

- 7.5.7. Mantendo a placa no suporte magnético, adicione 200 μL de etanol a 80% a cada amostra. Incube durante 30 segundos à temperatura ambiente.
- Utilizando uma pipeta P200 (ou pipeta multicanal equivalente) calibrada para 195 μL , aspire o etanol e elimine-o.
 - Utilize uma pipeta P10 (ou pipeta multicanal equivalente) calibrada para 10 μL para remover o excesso de etanol.
 - Evite remover quaisquer partículas magnéticas.
- 7.5.8. Repita a etapa 7.5.7 para um total de duas lavagens.
- 7.5.9. Com a placa ainda no suporte magnético, deixe as partículas magnéticas secar ao ar durante 5 minutos.

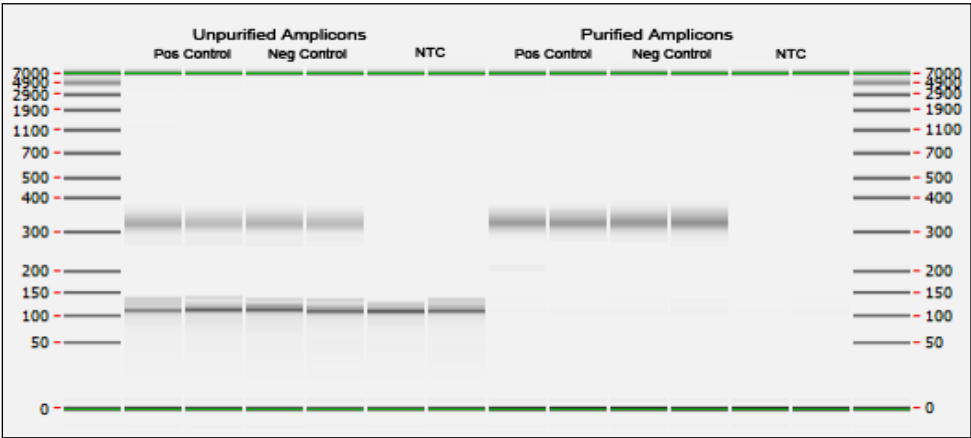
Eluição:

- 7.5.10. Retire a placa do suporte magnético. Adicione 25 μL de 10 mM Tris-HCl, tampão pH 8.0.
- Misture pipetando até ficar homogéneo.
 - Certifique-se de que todas as partículas magnéticas estão em solução.
- 7.5.11. Incube à temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 7.5.12. Coloque a placa no suporte magnético durante 5 minutos ou até o sobrenadante estar límpido.

- 7.5.13. Transfira 22 µL do eluato para uma nova placa. Sele com tiras de tampas. Rotule a placa e centrifugue brevemente para garantir que o sobrenadante assenta completamente no fundo do poço. Armazene a -20 °C ou prossiga para a próxima etapa.

A imagem do gel na Figura 1 ilustra a eficácia de uma purificação típica (mostrando os amplicons antes e após a purificação).

Figura 1: Exemplo de um resultado da purificação de amplicons a partir da TRG MiSeq Master Mix. A imagem foi gerada pela análise de produtos não purificados e purificados no LabChip GX.



7.6. Quantificação de Amplicons

As etapas que se seguem foram realizadas durante a validação do ensaio para quantificar amplicons de PCR purificados gerados a partir de amostras, bem como controlos positivos, negativos e sem molde utilizando o kit KAPA library quantification (Quantificação de biblioteca KAPA) (KAPA Biosystems).

7.6.1. Diluição de amplicons

O tampão de diluição A abaixo refere-se a: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 + 0,05% Tween 20

1: 4000 Final:

- Etapa A:** 2 µL de eluato de amplicon purificado + 198 µL de Tampão de diluição A.
Misture bem pipetando para cima e para baixo 10 vezes.
- Etapa B:** 5 µL da Etapa A + 195 µL de Tampão de diluição A.
Misture bem pipetando para cima e para baixo 10 vezes.

- 7.6.2. Prepare uma análise qPCR para quantificação de amplicons seguindo a Tabela 6 para cada reação (consulte as instruções do kit KAPA library quantification (Quantificação de biblioteca KAPA) para obter mais detalhes):

Tabela 6. Preparação da qPCR

Reagente	Volume
Água de grau PCR	3,6 µL
Master Mix KAPA SYBR FAST qPCR contendo Primer Premix	12,0 µL
ROX	0,4 µL
Amplicons diluídos ou Padrão (1-6)	4,0 µL
Volume Total	20,0 µL

- 7.6.3. Siga a Tabela 7 para o programa do termociclador para qPCR.

Tabela 7. Programa qPCR

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclo
1	95 °C	5 minutos	1
2	95 °C	30 segundos	35x
	60 °C	45 segundos (leitura da placa)	

- 7.6.4. Utilize os dados da análise qPCR para verificar a contaminação, calculando os valores ΔCt entre os controles (positivo e negativo) e o NTC, utilizando a seguinte equação:

$$\Delta Ct = Ct (NTC) - Ct (Controlo)$$

Se $\Delta Ct \geq 4,0$ para ambos os controles, avance para a etapa seguinte. Se $\Delta Ct < 4,0$ para um dos controles, consulte a secção 14 *Guia de Resolução de Problemas* para instruções adicionais.

No caso de multiplexação de vários alvos, consulte o Anexo A (secção 20) para a qualificação do valor ΔCt para outros produtos de PCR do LymphoTrack Dx Assay - MiSeq.

- 7.6.5. Utilize os dados da análise qPCR para determinar a concentração de amplicons para cada amostra utilizando a seguinte equação:

$$\text{Concentração de amplicons não diluídos (nM)} = \frac{452 \times \text{Conc. média (pM) calculada por qPCR}}{A} \times 4$$

452 representa o comprimento médio do fragmento (bp) do DNA Standard (Padrão de ADN) KAPA Illumina.

A = O comprimento médio do fragmento de amplicons gerados utilizando o ensaio **TRG** = 300 bp. (**A = 300**).
O comprimento das sequências inclui nucleótidos adicionais necessários para a sequenciação.

Nota: No caso de multiplexação de vários alvos, consulte o Anexo A (secção 20) para o comprimento médio do fragmento de amplicons gerados para outro LymphoTrack Dx Assay - MiSeq

7.7. Agrupamento e Quantificação da Biblioteca

A quantidade de ADN da biblioteca carregado para a MiSeq flow cell (lâmina de fluxo MiSeq) é crítica para gerar uma densidade ideal do conjunto e obter dados de elevada qualidade numa análise de sequenciação. Recomenda-se vivamente a quantificação da biblioteca por qPCR.

- 7.7.1. Com base na concentração de amplicons calculada a partir dos resultados de qPCR, adicione uma quantidade igual de amplicons (à exceção do NTC, que pode ser excluído).
- Por ex., dilua cada amplicon para 4 nM num volume total de 10 μ L utilizando o Tampão de diluição A como diluente. Combine 10 μ L de cada amplicon de 4 nM.
 - Para amostras com uma concentração <4 nM, adicione a quantidade máxima de amostra possível (10 μ L) e não adicione Tampão de diluição A a essa amostra.

- 7.7.2. Misture suavemente em vórtex, seguido por uma breve centrifugação.

7.8. Diluição da Biblioteca Agrupada

1:1000 Final:

Etapas A: 2 μ L de biblioteca agrupada + 198 μ L de Tampão de diluição A.
Misture bem pipetando para cima e para baixo 10 vezes.

Etapas B: 20 μ L da Etapa A + 180 μ L de Tampão de diluição A.
Misture bem pipetando para cima e para baixo 10 vezes.

7.9. Preparar qPCR para Library Quantification (Quantificação de Biblioteca)

Consulte a Tabela 6 para a preparação de qPCR e a Tabela 7 para o programa do termociclador.

- 7.9.1. Determine a concentração da biblioteca agrupada a partir dos resultados de qPCR.

$$\text{Concentração de amplicons não diluídos (nM)} = \frac{452 \times \text{Conc. média (pM) calculada por qPCR}}{A}$$

452 representa o comprimento médio do fragmento (bp) do DNA Standard (Padrão de ADN) KAPA Illumina.

A = O comprimento médio do fragmento de amplicons gerados utilizando o ensaio **TRG** = 300 bp. (**A = 300**).
O comprimento das sequências inclui nucleótidos adicionais necessários para a sequenciação.

Nota: No caso de multiplexação de vários alvos, consulte o Anexo A (secção 20) para o comprimento médio do fragmento de amplicons gerados para outro LymphoTrack Dx Assay - MiSeq

7.10. Preparação da Biblioteca para a Análise de Sequenciação MiSeq

No fim desta secção, a concentração do ADN da biblioteca será de **12 pM para o MiSeq reagent kit v2 (kit de reagente MiSeq v2)** e de **20 pM para o MiSeq reagent kit v3 (kit de reagente MiSeq v3)** aquando da multiplexação. Para a multiplexação de amplicons de diferentes ensaios LymphoTrack Dx para o MiSeq numa única biblioteca, consulte a secção 20: Anexo A: Criar uma Biblioteca de Sequenciação com Múltiplos Alvos NGS.

- 7.10.1. Determine a quantidade de biblioteca a preparar com base na concentração da biblioteca agrupada a partir dos resultados de qPCR e dilua, se necessário:
 - Se a biblioteca for superior a 4 nM, dilua a biblioteca para 4 nM num volume final de 10 µL utilizando o Tampão de diluição A.
 - Se a biblioteca for inferior a 4 nM, utilize 10 µL da biblioteca diretamente para a etapa seguinte.
- 7.10.2. Siga as instruções que se seguem para desnaturar o ADN da biblioteca.
 - Prepare uma nova solução de 0,2 N de NaOH. Preparar uma nova solução é essencial para desnaturar completamente o ADN de amostra e para gerar o conjunto ideal no MiSeq.
 - Adicione 10 µL de 0,2 N de NaOH à biblioteca diluída (10 µL) preparada na etapa anterior.

Tabela 8. Desnaturação da Biblioteca

Reagente	Volume
Biblioteca diluída	10 µL
0,2 N de NaOH	10 µL
Volume Total	20 µL

- 7.10.3. Misture brevemente a solução em vórtex e, em seguida, centrifugue para garantir que toda a solução assentou no fundo do tubo. Incube durante 5 minutos à temperatura ambiente para desnaturar a biblioteca de dsDNA num ADN de cadeia simples (ssDNA).
- 7.10.4. Adicione 980 µL de tampão HT1 pré-refrigerado (fornecido nos kits de reagente MiSeq) ao tubo que contém o ADN da biblioteca desnaturada:

Tabela 9. Adição de Tampão HT1

Reagente	Volume
Biblioteca desnaturada	20 µL
Tampão HT1	980 µL
Volume Total	1000 µL

- 7.10.5. Misture brevemente em vórtex e, em seguida, centrifugue a solução de ADN da biblioteca diluída e desnaturada.
- 7.10.6. Coloque a biblioteca diluída e desnaturada em gelo até à próxima etapa.
- 7.10.7. Retire a biblioteca ssDNA diluída do gelo e utilize as instruções que se seguem para diluir a biblioteca ainda mais, em preparação para o carregamento no MiSeq.

No caso de multiplexação de vários alvos, consulte o Anexo A (secção 20) para a concentração de carregamento e o MiSeq reagent kit (kit de reagente MiSeq).

No MiSeq Software Control (Software de controlo MiSeq) (v2.6 ou versão mais recente):

A concentração do ADN da biblioteca é de 12 pM para o MiSeq reagent kit v2 (kit de reagente MiSeq v2).

A concentração do ADN da biblioteca é de 12 a 20 pM para o MiSeq reagent kit v3 (kit de reagente MiSeq v3) no caso de multiplexação.

- Se a concentração da biblioteca de ssDNA for 40 pM (*isto é*, a concentração inicial era 4 nM), dilua a biblioteca para a concentração de carregamento pretendida no MiSeq utilizando os seguintes exemplos:

Tabela 10. Preparação da Biblioteca para Carregamento no MiSeq

Concentrações Finais	12 pM
Biblioteca desnaturada	300 µL
Tampão HT1	700 µL
Concentração final de NaOH (mM)	0,60 mM

- Se a concentração da biblioteca de ssDNA for inferior a 40 pM (a concentração inicial era inferior a 4 nM), dilua adequadamente o ADN desnaturado para a concentração de carregamento pretendida no MiSeq (*por ex.*, 12 pM).
- Certifique-se de que a concentração final de NaOH não é superior a 1,0 mM.

7.10.8. Inverta a biblioteca final 5 vezes para misturar e centrifugue por impulsos.

7.10.9. Coloque a biblioteca final preparada em gelo até ser carregada no MiSeq Reagent Cartridge (Cartucho de reagente MiSeq).

7.11. Carregamento da MiSeq Flow Cell (Lâmina de fluxo MiSeq)

Carregue 600 µL da biblioteca final preparada num MiSeq Reagent Cartridge (Cartucho de reagente MiSeq).

7.12. Configuração da MiSeq Sample Sheet (Folha de amostras MiSeq)

Consulte a documentação mais recente da Illumina para a criação da planilha de amostras. Carregue a planilha de amostras no instrumento MiSeq. Se estiver a usar software associado à Illumina (como o Local Run Manager (LRM)), selecione *TruSeq Nano DNA (TruSeq Nano ADN)* para o Library Prep Kit (Kit de preparação de bibliotecas) e *TruSeq DNA Single Indexes Set A B (TruSeq Conjunto A B de indexadores únicos de ADN)* para o Index Kit (Kit de indexadores).

Caracteres no nome da amostra:

- Crie um nome e identificador únicos a cada amostra ao designar as amostras. Se estiver a analisar amostras em duplicado, pode usar um nome semelhante (*i.e.*, Amostra1a e Amostra1b).
- Se não atribuir nomes únicos às amostras sequenciadas em conjunto na mesma lâmina de fluxo, apenas uma amostra será analisada pelo LymphoTrack Dx Software – MiSeq durante o processo de análise.
- Utilize apenas alfanuméricos e hífens (A-Z, a-z, 0-9, -, ., _) ao preparar a Sample Sheet (Folha de amostras).

Nome da amostra na multiplexação:

Cada índice só pode ser incluído na Sample Sheet (Folha de amostras) uma vez. Assim sendo, qualquer informação de localização necessária para amostras sequenciadas com múltiplos alvos utilizando o mesmo índice deve ser incluída num único campo Sample ID (ID de amostra) (que é incorporado no nome do ficheiro FASTQ).

Acompanhe todas as amostras e alvos numa análise MiSeq que são sequenciados utilizando o mesmo índice. Deve dar-se a este conjunto de amostras/alvos um identificador único, a incluir no campo Sample ID (ID de amostra) na Sample Sheet (Folha de amostras). Lembre-se de que o campo Sample ID (ID de amostra) tem um limite rigoroso **de 40 caracteres na seleção da convenção de denominação**.



O campo *Sample Name (Nome de amostra)* na *Sample Sheet (Folha de amostras)* é incorporado por predefinição no nome do ficheiro FASTQ em vez da *Sample ID (ID de amostra)* quando a informação é introduzida neste campo. Deixe este campo em branco ou copie a informação que foi introduzida no campo *Sample ID (ID de amostra)*. Se forem introduzidas informações alternativas no campo *Sample Name (Nome de amostra)*, certifique-se de que inclui um identificador único e segue as recomendações acima para a localização de amostras.

Importante!

As sequências de adaptadores não são reconhecidas pelo LymphoTrack Dx Software – MiSeq.

- ☒ Se estiver usando software associado à Illumina (como Local Run Manager (LRM)), **tem de selecionar a opção Adapter trimming (Corte de adaptador) ao criar a folha de amostras.**

Tabela 11. Índices usados com amostras dos LymphoTrack Dx Assays

LymphoTrack Dx Assay – MiSeq PCR Master Mix Indexada	Sequência do Índice	TruSeq DNA Single Indexes Set A B (TruSeq Conjunto A B de indexadores únicos de ADN) [LRM “Index Kit” (Kit de indexadores)]
id01	ATCACG	AR001
id02	CGATGT	AR002
id03	TTAGGC	AR003
id04	TGACCA	AR004
id05	ACAGTG	AR005
id06	GCCAAT	AR006
id07	CAGATC	AR007
id08	ACTTGA	AR008
id09	GATCAG	AR009
id10	TAGCTT	AR010
id11	GGCTAC	AR011
id12	CTTGTA	AR012
id13	AGTCAA	AR013
id14	AGTTCC	AR014
id15	ATGTCA	AR015
id16	CCGTCC	AR016
id18	GTCCGC	AR018
id19	GTGAAA	AR019
id20	GTGGCC	AR020
id21	GTTTCG	AR021
id22	CGTACG	AR022
id23	GAGTGG	AR023
id25	ACTGAT	AR025
id27	ATTCTT	AR027

7.13. Início da Análise MiSeq

Inicie a análise MiSeq seguindo as instruções do MiSeq Control Software (Software de controlo MiSeq). Os tempos de análise MiSeq aproximados são indicados na Tabela 13.

Tabela 12. Tempos de Análise MiSeq

MiSeq Reagent Kit (Kit de Reagente MiSeq)	Duração da Leitura	Versão MCS	Tempo de Análise MiSeq Total
v2	2x151 bp	v2.6 ou versão mais recente	~ 24 horas
	2x251 bp	v2.6 ou versão mais recente	~ 39 horas
v3	2x301 bp	v2.6 ou versão mais recente	~ 56 horas

Nota: A utilização de um kit com menos ciclos não será suficiente para gerar leituras com a duração exigida para este ensaio.

8. Análise de Dados

O LymphoTrack Dx TRG Assay – MiSeq foi concebido para produzir dados de sequenciação que podem ser analisados utilizando o pacote LymphoTrack Dx Software – MiSeq fornecido no CD associado ([REF](#) 95000009), que está incluído na compra do ensaio. **Este CD inclui instruções detalhadas para a instalação e utilização do pacote do software.**

9. Valores Esperados

Os cálculos gerados pelo software são arredondados até à décima mais próxima para determinação do resultado do ensaio.

- % de primeiras leituras do controlo positivo do *TRG* $\geq 2,5\%$
- % de primeiras leituras do controlo negativo NGS $< 1,0\%$
- Validade da análise MiSeq
 - %Q30 $> 80\%$ para v2 (2x151)
 - %Q30 $> 75\%$ para v2 (2x251)
 - %Q30 $> 70\%$ para v3 (2x301)

***Nota:** O Q30 de todas as validações analíticas cumpriu os critérios acima da especificação Q30 do sistema Illumina MiSeq. Contudo, o score Q30 pode variar dependendo da qualidade da amostra. Se o Q30 apresentar um valor inferior à especificação Q30 do sistema Illumina, verifique o valor Q30 do índice do relatório do LymphoTrack Dx após a análise de dados pelo LymphoTrack Dx Software - MiSeq. Se um score Q30 do índice no relatório do LymphoTrack Dx não cumprir a especificação do sistema Illumina, considere esse índice inválido.

A química do MiSeq v2 foi validada para este ensaio de alvo único. A química do MiSeq v3 foi validada para multiplexação do ensaio.

10. Limitações do Procedimento

- Este ensaio não identifica 100% das populações de células clonais.
- Um nível de variância superior, ao nível ou próximo do limite de deteção (LoD) analítico, é inerente à maior parte das tecnologias, incluindo, entre outras, a sequenciação de nova geração. Recomendam-se análises de seguimento quando um resultado se apresenta próximo do LoD analítico do ensaio.
- Os ensaios baseados em PCR estão sujeitos a interferências por degradação do ADN ou inibição da amplificação por PCR devido a heparina ou outros agentes que possam estar presentes na amostra analisada.
- Os resultados dos testes de clonalidade molecular devem ser sempre interpretados no contexto de dados clínicos, histológicos e imunofenotípicos.

11. Interpretação e Relatório

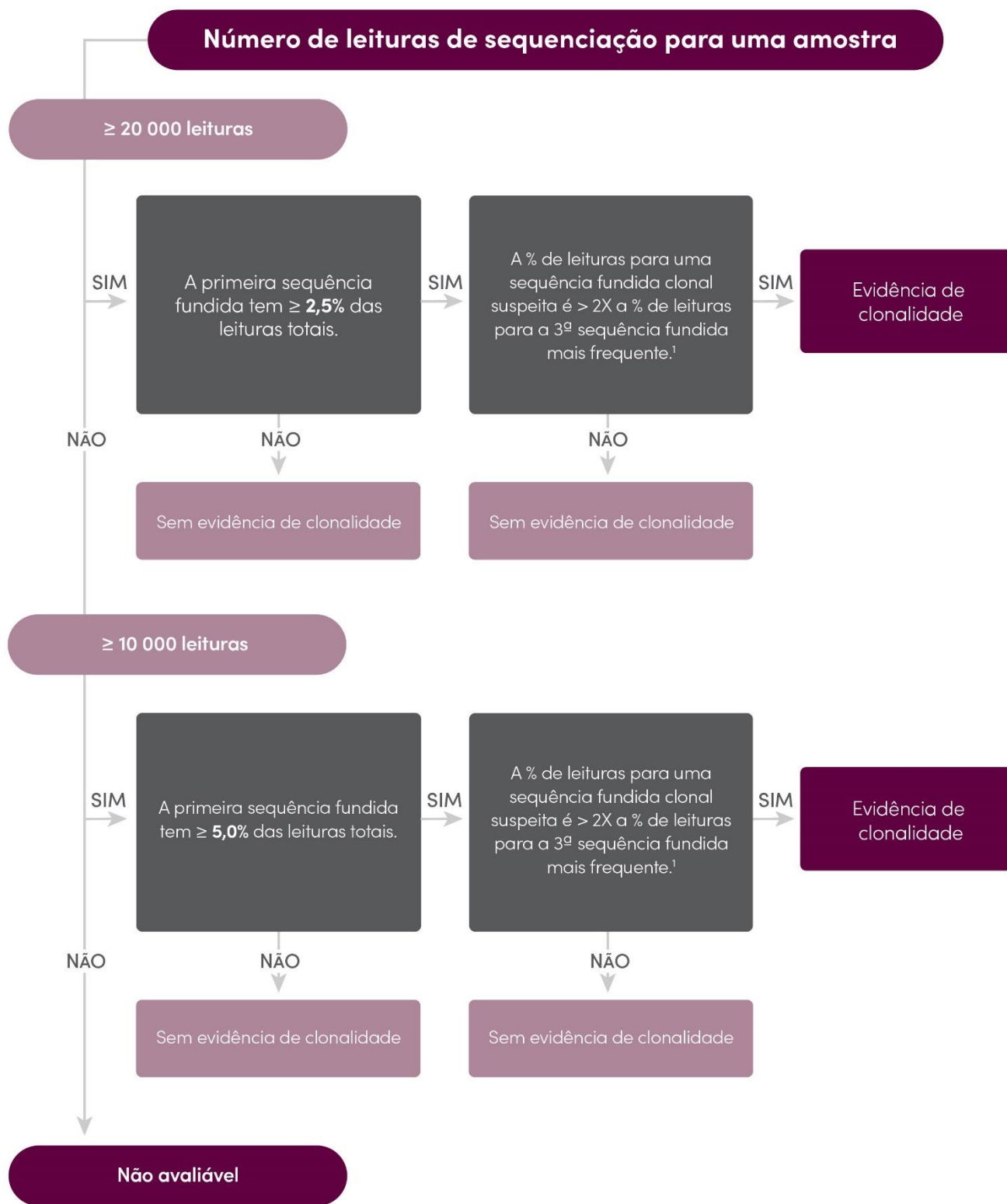
O relatório de *Merged Read Summary* (*Resumo das leituras fundidas*) deve ser utilizado para identificar as principais sequências de leitura fundidas e as suas frequências antes da determinação da clonalidade, utilizando os critérios apresentados abaixo. Consulte a secção 8: *Análise de Dados* para obter mais informações sobre o relatório *Merged Read Summary* (*Resumo das leituras fundidas*). Existem alguns processos clonais que podem resultar na deteção de dois ou mais clones. Exemplos de tal incluem uma população dominante com uma pequena população subclonal ou quando estão presentes várias doenças linfoproliferativas. É especialmente importante que estes casos sejam interpretados no seu contexto clínico.

*Tenha cuidado ao interpretar a presença de “none” (“nenhum”) para o gene V, D e/ou J em leituras clonais suspeitas. “None” (“Nenhum”) é atribuído quando o alinhamento não cumpre o limiar mínimo de qualidade devido a um alinhamento de qualidade inferior.

Tabela 13. Critérios de Interpretação

Critério 1	Critério 2	Critério 3	Resultado
O número total de leituras por amostra é $\geq 20\,000$.	A primeira sequência fundida tem $\geq 2,5\%$ do total de leituras.	A % de leituras para uma sequência fundida clonal suspeita é $> 2X$ a % de leituras para a 3ª sequência fundida mais frequente. ¹	EVIDÊNCIA DE CLONALIDADE DETETADA
		A % de leituras para uma sequência fundida clonal suspeita é $\leq 2X$ a % de leituras para a 3ª sequência fundida mais frequente. ¹	Sem evidência de clonalidade detetada
O número total de leituras por amostra é $\geq 10\,000$ e $< 20\,000$.	A primeira sequência fundida tem $\geq 5,0\%$ das leituras totais.	A % de leituras para uma sequência fundida clonal suspeita é $> 2X$ a % de leituras para a 3ª sequência fundida mais frequente. ¹	EVIDÊNCIA DE CLONALIDADE DETETADA
		A % de leituras para uma sequência fundida clonal suspeita é $\leq 2X$ a % de leituras para a 3ª sequência fundida mais frequente. ¹	Sem evidência de clonalidade detetada
O número total de leituras por amostra é $< 10\,000$.	N/A	N/A	Não avaliável

¹Os cálculos gerados pelo software são arredondados até à décima mais próxima para comparação.



¹Os cálculos gerados pelo software são arredondados até à décima mais próxima para comparação.

LymphoTrack[®]Dx
Assays

Figura 2: Interpretação de dados com base em critérios da Tabela 13.

12. Dados de Amostras

LymphoTrack Dx Report for assay TRG

Sample name: TRG_positive_S23_L001_001_combined

Total Read Count: 337023

IndexQ30: 97.54

Caution: Do not edit fields and save.

Top 10 Merged Read Summary

Rank	Sequence	Length	Merge count	V-gene	J-gene	% total reads	Cumulative %	CDR3 Sequence
1	GAAGACTAAGAACTTG	147	35198	Vg11	Jg1/2	10.44	10.44	not found
2	GGAATCAGTCGAGAAAA	142	15777	Vg8	Jg1/2	4.68	15.13	GCCACCTGGAAATTTTA
3	TGGGTAAGACAAGCAAC	147	3164	Vg10	JgP1	0.94	16.06	GCTGCGTGGGATACCA
4	TGGGTAAGACAAGCAAC	141	2472	Vg10	JgP1	0.73	16.80	GCTGCGTGGGATGGTTC
5	TGGGTAAGACAAGCAAC	150	2354	Vg10	JgP1	0.70	17.50	GCTGCGTGGGATTATAC
6	TGGGTAAGACAAGCAAC	157	623	Vg10	JgP1	0.18	17.68	not found
7	GAAGACTAAGAACTTG	147	549	Vg11	JgP1	0.16	17.84	not found
8	GGAATCAGTCGAGAAAA	151	510	Vg8	JgP1	0.15	17.99	GCCACCTGGGATACCC
9	TGGGTAAGACAAGCAAC	155	503	Vg10	JgP1	0.15	18.14	not found
10	GGAGTCAGTCCAGGGA	144	424	Vg2	JgP1	0.13	18.27	not found

Figura 3: Esta tabela, gerada com o LymphoTrack Dx Software - MiSeq, mostra as 10 primeiras leituras do resumo fundidas com as primeiras 500 leituras. Uma leitura é fundida com outra se apresentarem apenas uma diferença de 1 ou 2 pares de bases. As sequências foram geradas utilizando o LymphoTrack Dx TRG Assay – MiSeq e analisadas com o LymphoTrack Dx Software – MiSeq (REF 95000009).

13. Características de Desempenho

Os resultados do LymphoTrack Dx TRG Assay – MiSeq foram comparados com o relatório de diagnóstico de laboratório e a concordância (ou concordância percentual global), a concordância percentual positiva (PPA) e a concordância percentual negativa (NPA) foram: 89% (51/57 casos), 81% e 97%, respetivamente.

Tabela 14. Comparação entre o LymphoTrack Dx TRG Assay – MiSeq e o Relatório de Diagnóstico do Laboratório

		Relatório de Diagnóstico do Laboratório	
		Clonal	Não Clonal
LymphoTrack Dx TRG Assay - MiSeq	Clonal	22	1
	Não Clonal	5	29

O desempenho analítico do LymphoTrack Dx TRG Assay – MiSeq foi avaliado através da análise de ADN de uma linha celular clonal introduzida no ADN de amígdala faríngea a diferentes diluições. O limite de deteção (LoD) foi observado em ADN diluído a 5%. A % mais alta de leituras de ADN da amígdala faríngea foi <1%. A regressão linear R² foi >0,98 para um intervalo de 0 a 10% da diluição do ADN. O coeficiente de variação (CV%) em 8 análises por 2 operadores, com 2 lotes de reagentes e 2 equipamentos, foi inferior a 15% ao testar diluições do ADN a 5% e 10%.

14. Guia de Resolução de Problemas

Tabela 15. Guia de Resolução de Problemas

Ocorre Durante	Erro	Ação
Preparação de amostras e reagentes	A quantidade de ADN da amostra é inferior a 50 ng por um método baseado em dsDNA	Não analise a amostra
Preparação de amostras e reagentes	A integridade do ADN de amostra é baixa	Analise a amostra utilizando a Specimen Control Size Ladder (Escala de Tamanhos de Controlo de Amostras) fornecida pela Invivoscribe  20960021 para deteção ABI ou  20960020 para deteção em gel)
Quantificação de amplicons utilizando o kit KAPA library quantification (Quantificação de biblioteca KAPA)	$\Delta Ct < 4,0$ $\Delta Ct = Ct (NTC) - Ct (Controlo)$	Verifique a curva padrão na qPCR. Verifique a existência de contaminação e repita a qPCR KAPA para todas as amostras e controlos. Se $\Delta Ct < 4,0$ novamente, repita a PCR e a qPCR para todas as amostras e controlos.
Criação da biblioteca por quantificação e agrupamento de amplicons	A concentração de amplicons é inferior a 1 nM	Verifique a curva padrão na qPCR e repita a PCR se inferior a 1 nM
Preparação da análise MiSeq	Folha de amostras não encontrada	Consulte a resolução de problemas do sistema Illumina ou contacte o Apoio Técnico da Illumina +1-800-809-4566
	Folha de amostras incorretamente formatada	
	Falha na verificação dos fluidos	
	Espaço em disco reduzido	
	Frasco de resíduos vazio	
	Rede desligada	
	Falha RFID	
Análise MiSeq	%Q30 <80% para v2 (2x151)* %Q30 <75% para v2 (2x251)* %Q30 <70% para v3 (2x301)*	Contacte o Apoio Técnico da Invivoscribe +1-858-224-6600
Instalação com CD	O Software LymphoTrack Dx não se instala corretamente	Contacte o Apoio Técnico da Invivoscribe +1-858-224-6600
Análise de Dados	O Software LymphoTrack Dx deixa de funcionar	Contacte o Apoio Técnico da Invivoscribe +1-858-224-6600
Análise de Dados	Não é detetada nenhuma sequência clonal para o Controlo Positivo	Contacte o Apoio Técnico da Invivoscribe +1-858-224-6600
Controlo Sem Molde (NTC)	O NTC apresenta amplificação após a PCR	Repita o ensaio

* O Q30 de todas as validações analíticas cumpriu os critérios acima da especificação Q30 do sistema Illumina MiSeq. Contudo, o score Q30 pode variar dependendo da qualidade da amostra. Se o Q30 apresentar um valor inferior à especificação Q30 do sistema Illumina, verifique o valor Q30 do índice do relatório do LymphoTrack Dx após a análise de dados pelo LymphoTrack Dx Software - MiSeq. Se um score Q30 do índice no relatório do LymphoTrack Dx não cumprir a especificação do sistema Illumina, considere esse índice inválido.

15. Serviços Técnicos e Apoio ao Cliente

Obrigado por adquirir o nosso LymphoTrack Dx TRG Assay – MiSeq. Damos valor ao seu negócio. Temos todo o gosto em auxiliá-lo/a na compreensão deste ensaio e em fornecer-lhe assistência técnica contínua, de segunda a sexta-feira, para manter o desempenho eficiente dos ensaios no seu laboratório.

Informações para Contacto



Invivoscribe, Inc

10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego | California 92121-2711 | EUA

Telefone: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Horário de funcionamento: 9:00 – 17:00 GMT - 8/GMT - 7

Serviços Técnicos: support@invivoscribe.com | Apoio ao Cliente: sales@invivoscribe.com | Website: www.invivoscribe.com

16. Bibliografia

1. Tonegawa, S. (1983). Somatic Generation of Antibody Diversity. *Nature* 302, 575-581
 2. Trainor KJ. *et al.*, (1990). Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level. *Blood* 75, 2220-2222
 3. Miller, JE. (2013). Principle of Immunoglobulin and T Cell Receptor Gene Rearrangement. Em Cheng, L., Zhang, D., Eble, JN. (Eds), *Molecular Genetic Pathology* (2nd Ed., sections 30.2.7.13 and 30.2.7.18). New York, EUA: Springer Science & Business Media.
 4. JJM van Dongen *et al.*, (2003). Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17, 2257–2317.
- Instruções de utilização do pacote LymphoTrack Dx Software – MiSeq (**REF** 95000009)
 - <https://www.beckmancoulter.com>
 - <http://www.illumina.com>
 - <http://www.invitrogen.com>
 - <http://www.kapabiosystems.com>
 - <http://www.thermofisher.com>

17. Símbolos

Os seguintes símbolos são utilizados na rotulagem dos produtos de NGS de diagnóstico da Invivoscribe.

REF	Referência do catálogo		Data de validade
VOL	Volume de reagente	EC REP	Representante autorizado na União Europeia
LOT	Número de lote		Consulte as instruções de utilização
	Condições de armazenamento	IVD	Para utilização em diagnóstico <i>in vitro</i>
UDI	Identificador de Dispositivo Exclusivo		Fabricante
UK CA	Conformidade do Reino Unido Avaliada	UKRP	Pessoa responsável no Reino Unido
CH REP	Representante Autorizado Suíço	CE	Conformidade Europeia
	Aplicação de software		

18. Aviso Legal

Este produto está protegido por uma ou mais das seguintes patentes e pedidos de patente detidas por ou licenciadas exclusivamente à Invivoscribe, Inc. (IVS). Patente dos EUA número 7785783, Patente dos EUA número 8859748 (juntamente com as reivindicações do pedido divisionário relativas ao registo original), Patente europeia número EP 1549764B1 (válida em 16 países e reforçada por Patentes europeias relacionadas com os números EP 2418287A3 e EP 2460889A3), Patente japonesa número JP04708029B2, Pedido de patente japonesa número 2006-529437, Pedido de patente brasileira número PI0410283.5, Patente canadiana número CA2525122, Patente indiana número IN243620, Patente mexicana número MX286493, Patente chinesa número CN1806051 e Patente coreana número 101215194.

A utilização deste produto pode exigir métodos de amplificação de ácidos nucleicos, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Qualquer licença necessária para executar métodos de amplificação ou para utilizar reagentes, enzimas de amplificação ou equipamentos protegidos por patentes de terceiros é da responsabilidade do utilizador e não será concedida pela Invivoscribe, Inc., expressamente ou de forma implícita.

©2024 Invivoscribe, Inc. Todos os direitos reservados. As marcas comerciais mencionadas neste documento são propriedade da Invivoscribe, Inc. e/ou das suas afiliadas, ou (como em relação às marcas comerciais de terceiros utilizadas neste documento) dos seus respetivos proprietários.

19. LymphoTrack Dx TRG Assay - MiSeq: Guia de Página Única

- 19.1. Com as mãos protegidas com luvas, retire as Master Mixes do congelador. Deixe os tubos descongelar. Em seguida, agite suavemente no vórtex para misturar.
- 19.2. Numa câmara de fluxo laminar ou câmara isolada, pipete 45 µL de Master Mix para poços individuais de uma placa de PCR. Um poço para cada Master Mix e uma Master Mix por amostra, controlo positivo, negativo e sem molde.
- 19.3. Adicione 0,2 µL de ADN Taq polimerase (a 5 U/µL) a cada uma das Master Mixes.
- 19.4. Adicione 5 µL de ADN de amostra (numa concentração mínima de 10 ng/µL) e 5 µL de amostras de controlo aos poços contendo as respetivas reações de Master Mix e pipete para cima e para baixo 5 a 10 vezes para misturar.
- 19.5. Adicione 5 µL de água para biologia molecular ao poço contendo a respetiva Master Mix para o controlo sem molde, e pipete para cima e para baixo 5 a 10 vezes para misturar.
- 19.6. Amplifique o ADN alvo utilizando o seguinte programa do termociclador:

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclo
1	95 °C	7 minutos	1
2	95 °C	45 segundos	29x
3	60 °C	45 segundos	
4	72 °C	90 segundos	
5	72 °C	10 minutos	1
6	15 °C	∞	1

- 19.7. Retire a placa de amplificação do termociclador.
- 19.8. Purifique os produtos de PCR utilizando o sistema PCR Purification (Purificação de PCR) Agencourt AMPure XP. Adicione 50 µL de partículas a cada 50 µL de reação; efetue a eluição do ADN em 25 µL de eluato.
- 19.9. Quantifique os amplicons utilizando o kit KAPA library quantification (Quantificação de biblioteca KAPA) seguindo as instruções do kit. Dilua os amplicons a 1:4000 antes de avançar para a qPCR.
- 19.10. Agrupe quantidades iguais de amplicons das amostras (não inclua o controlo sem molde), dilua 1:1000 e quantifique a biblioteca utilizando o kit KAPA library quantification (Quantificação de biblioteca KAPA).
- 19.11. Desnature e dilua a biblioteca a 12 pM para o MiSeq reagent kit v2 (kit de reagente MiSeq v2) e 12 a 20 pM para o MiSeq reagent kit v3 (kit de reagente MiSeq v3) aquando da multiplexação (MCS v2.6 ou versão mais recente).
- 19.12. Carregue 600 µL da biblioteca desnaturada e diluída para o MiSeq Reagent Cartridge (Cartucho de reagente MiSeq).
- 19.13. Prepare uma MiSeq Sample Sheet (Folha de amostras MiSeq) e carregue a planilha de amostras no instrumento (se necessário).
- 19.14. Inicie a análise MiSeq.
- 19.15. Analise e visualize os dados adquiridos utilizando o pacote LymphoTrack Dx Software – MiSeq associado.

20. Anexo A: Criar uma Biblioteca de Sequenciação com Múltiplos Alvos NGS

Ao analisar múltiplos alvos utilizando diferentes LymphoTrack Dx Assay - MiSeq em paralelo, é importante registrar as diferenças de procedimento entre cada ensaio. Por exemplo, o ensaio Líder *IGHV* utiliza 32 ciclos de PCR e deve ser colocado numa análise de ciclagem térmica separada de outros Ensaios LymphoTrack Dx que utilizam apenas 29 ciclos de PCR. A Tabela 16, abaixo, resume as diferenças de procedimento. Para instruções completas, consulte as instruções de utilização do respetivo LymphoTrack Dx Assay – MiSeq.

Tabela 16. Diferenças de procedimento do Ensaio LymphoTrack Dx

Procedimento Etapa	Descrição	LymphoTrack Dx Assay - MiSeq						
		Líder <i>IGHV</i>	<i>IGH</i> FR1	<i>IGH</i> FR2	<i>IGH</i> FR3	<i>IGK</i>	<i>TRG</i>	<i>TRB</i>
7.4.1	Número de ciclos de PCR	32	29	29	29	29	29	29
7.5.1	Volume de reagente AMPure XP (Rácio)	50 µL (Rácio 1:1)	50 µL (Rácio 1:1)	50 µL (Rácio 1:1)	50 µL (Rácio 1:1)	50 µL (Rácio 1:1)	50 µL (Rácio 1:1)	35 µL (Rácio 0,7:1)
7.6.4	Verificação de contaminação Valor $\Delta Ct =$ Ct (NTC) – Ct (Controlo)	$\Delta Ct \geq 4,0$	$\Delta Ct \geq 4,0$	$\Delta Ct \geq 4,0$	$\Delta Ct \geq 4,0$	$\Delta Ct \geq 4,0$	$\Delta Ct \geq 4,0$	$\Delta Ct \geq 3,0$
7.6.5 e 7.9.1	A (Comprimento médio do fragmento)	660 bp	450 bp	390 bp	260 bp	410 bp	300 bp	400 bp
7.10.7	Concentração de carregamento	12 - 20 pM	12 pM	12 pM	12 pM	8 pM	12 pM	12 pM
	MiSeq Reagent Kit (Kit de reagente MiSeq) para sequenciação de alvo único*	v3 (600)	v2 (500)	v2 (500)	v2 (300) v2 (500)	v2 (500)	v2 (300) v2 (500)	v2 (500)
7.12	Definições da folha de amostras para: Cycles Read 1* (Leitura do ciclo 1*) Cycles Read 2* (Leitura do ciclo 2*)	301	251	251	151	251	151	251

***Nota:** A química do MiSeq v2 foi validada para estes ensaios de alvo únicos. A química do MiSeq v3 foi validada para o Líder *IGHV* e para multiplexação do ensaio.

Duas ou mais bibliotecas de sequenciação geradas a partir das mesmas master mixes de genes alvo LymphoTrack (*p. ex.*, duas bibliotecas de sequenciação do *TRG*, do mesmo lote de kits ou de lotes diferentes) podem também ser multiplexadas em conjunto numa única biblioteca de sequenciação, desde que cada índice para essa master mix seja apenas incluído uma vez por análise de sequenciação. Consulte a tabela que se segue para determinar as definições dos ciclos e os kits de reagente Illumina MiSeq a utilizar com diferentes combinações de alvos. Recomenda-se a utilização do MiSeq reagent kit v3 (kit de reagente MiSeq v3) aquando da sequenciação dos sete alvos em conjunto, a fim de se obterem leituras suficientes por amostra.

Tabela 17. Definições dos Ciclos e Kits de Reagente para uma Análise MiSeq com Múltiplos Alvos

Alvos de Multiplexação	Definições da Folha de Amostras	MiSeq Reagent Kit	Concentração de Carregamento	Ref. Catálogo
Apenas <i>IGH</i> FR3 e <i>TRG</i> em conjunto	151 cycles Read 1 151 cycles Read 2	v2 kit (300 ciclos) ou v2 kit (500 ciclos)	12 pM (v2) ou 20 pM (v3)	MS-102-2002 ou MS-102-2003
Qualquer combinação destes alvos em conjunto: <i>IGH</i> FR1, <i>IGH</i> FR2, <i>IGH</i> FR3, <i>IGK</i> , <i>TRB</i> e <i>TRG</i>	251 cycles Read 1 251 cycles Read 2	v2 kit (500 ciclos) até 4 alvos ou v3 kit (600 ciclos)	12 pM (v2) ou 20 pM (v3)	MS-102-2003 ou MS-102-3003
Ao combinar qualquer um dos ensaios com o Líder <i>IGHV</i>	301 cycles Read 1 301 cycles Read 2	v3 kit (600 ciclos)	20 pM (v3)	MS-102-3003

20.1. Determine a concentração de cada biblioteca individual, (*por ex.*, Líder *IGHV*, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* e *TRG*).

20.2. Determine a quantidade de cada biblioteca a desnaturar.

Na tabela abaixo, os Casos A, B, C, D, E e F são exemplos diferentes de multiplexação do ensaio (*por ex.*, o Caso A é uma multiplexação de Líder *IGHV*, *IGH FR1*, *IGH FR2*, *IGH FR3*, *IGK*, *TRB* e *TRG*). T, U, V, W, X, Y e Z são volumes em μL .

n	=	número de alvos a carregar num cartucho MiSeq
T	=	40 fmole / [n x concentração da biblioteca de Líder <i>IGHV</i> (nM)]
U	=	40 fmole / [n x concentração da biblioteca <i>IGH FR1</i> (nM)]
V	=	40 fmole / [n x concentração da biblioteca <i>IGH FR2</i> (nM)]
W	=	40 fmole / [n x concentração da biblioteca <i>IGH FR3</i> (nM)]
X	=	40 fmole / [n x concentração da biblioteca <i>IGK</i> (nM)]
Y	=	40 fmole / [n x concentração da biblioteca <i>TRG</i> (nM)]
Z	=	40 fmole / [n x concentração da biblioteca <i>TRB</i> (nM)]

Nota: O valor 40 fmole corresponde aos 20 μL de 2 nM no fim da etapa 20.3.

Tabela 18. Cálculo de Dados de Bibliotecas Individuais para gerar uma Biblioteca de Sequenciação de Múltiplos Alvos para a Análise MiSeq

Biblioteca		Volume da Biblioteca Individual (μL)						
Nome do Ensaio	Concentração (nM)		Caso A n=7	Caso B n=6	Caso C n=5	Caso D n=4	Caso E n=3	Caso F n=2
Líder <i>IGHV</i>	2,3	T	2,5	2,9	3,5	4,3		
<i>IGH FR1</i>	1,5	U	3,8	4,4	5,3	6,7	8,9	
<i>IGH FR2</i>	4	V	1,4	1,7	2	2,5	3,3	
<i>IGH FR3</i>	2,1	W	2,7	3,2	3,8	4,8	6,4	
<i>IGK</i>	3,5	X	1,6	1,9	2,3			5,7
<i>TRG</i>	2,6	Y	2,2	2,6				7,7
<i>TRB</i>	2	Z	2,9					
		T+U+V+W+X+Y+Z	17,1	16,7	16,9	18,3	18,6	13,4

20.3. Desnature as bibliotecas combinadas para 2 nM.

- Adicione reagentes de acordo com a Tabela 19 com base na quantidade determinada na etapa anterior.

Se $T+U+V+W+X+Y+Z > 18$, como nos casos D e E na Tabela 18, misture as bibliotecas aplicáveis primeiro e, em seguida, adicione 18 μL à reação desnaturada, conforme apresentado na tabela que se segue.

Tabela 19. Desnaturação da Biblioteca

Reagente	Volume (μL)
Biblioteca de Líder <i>IGHV</i>	T
Biblioteca de <i>IGH FR1</i>	U
Biblioteca de <i>IGH FR2</i>	V
Biblioteca de <i>IGH FR3</i>	W
Biblioteca de <i>IGK</i>	X
Biblioteca de <i>TRG</i>	Y
Biblioteca de <i>TRB</i>	Z
1N NaOH	2
10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,05% Tween 20	18 – (T+U+V+W+X+Y+Z)
Total	20

Misture brevemente a solução em vórtex e, em seguida, centrifugue para garantir que toda a solução assentou no fundo do tubo. Incube durante 5 minutos à temperatura ambiente para desnaturar o ADN da biblioteca combinado em cadeias simples.

20.4. Dilua a biblioteca desnaturada para 40 pM.

Adicione 980 µL de tampão HT1 pré-refrigerado (fornecido no MiSeq Reagent kit (kit de reagente MiSeq)) ao tubo que contém 20 µL de ADN da biblioteca desnaturada. Misture brevemente em vórtex e centrifugue a amostra por impulsos.

20.5. Prepare a biblioteca desnaturada para carregamento no MiSeq.

Dilua a biblioteca para 12 pM para o MiSeq reagent kit v2 (kit de reagente MiSeq v2) e 20 pM para o MiSeq reagent kit v3 (kit de reagente MiSeq v3) aquando da multiplexação (MCS v2.6 ou versão mais recente) seguindo a Tabela 20. Misture brevemente em vórtex e centrifugue a amostra por impulsos.

Tabela 20. Preparação da Biblioteca Combinada para Carregamento no MiSeq

Reagente	Volume	
	12 pM	20 pM
Biblioteca de 40 pM	300 µL	500 µL
Tampão HT1 refrigerado	700 µL	500 µL
Total	1000 µL	1000 µL

20.6. Carregue 600 µL da biblioteca desnaturada combinada da etapa anterior para um MiSeq Reagent Cartridge (Cartucho de reagente MiSeq).

20.7. Prepare uma MiSeq Sample Sheet (Folha de amostras MiSeq) e carregue a planilha de amostras no instrumento (se necessário).

20.8. Inicie a análise MiSeq.

20.9. Analise e visualize os dados adquiridos utilizando o pacote LymphoTrack Dx Software – MiSeq associado.