

## Instruções de Utilização




# LymphoTrack<sup>®</sup> Dx TRB Assay – MiSeq™

Para identificar e localizar rearranjos génicos do recetor beta de células T clonais (TRB) utilizando Sequenciação de Nova Geração (NGS) com o sistema Illumina<sup>®</sup> MiSeq.

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

Representação esquemática do locus do gene TRB:



 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

**REF** 92250009  
**REF** 92250019

### Produtos

LymphoTrack Dx TRB Assay Kit A – MiSeq  
LymphoTrack Dx TRB Assay Panel – MiSeq

### Quantidade

8 índices – 5 reações cada  
24 índices – 5 reações cada

# Índice

|            |                                                                                   |           |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b>  | <b>UTILIZAÇÃO PRETENDIDA .....</b>                                                | <b>3</b>  |
| <b>2.</b>  | <b>RESUMO E EXPLICAÇÃO DO ENSAIO .....</b>                                        | <b>3</b>  |
| 2.1.       | Contextualização .....                                                            | 3         |
| 2.2.       | Resumo.....                                                                       | 3         |
| <b>3.</b>  | <b>PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO .....</b>                                           | <b>4</b>  |
| 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         |
| <b>4.</b>  | <b>REAGENTES.....</b>                                                             | <b>6</b>  |
| 4.1.       | Componentes dos Reagentes .....                                                   | 6         |
| 4.2.       | Advertências e Precauções.....                                                    | 7         |
| 4.3.       | Armazenamento e Manuseamento.....                                                 | 7         |
| <b>5.</b>  | <b>EQUIPAMENTOS.....</b>                                                          | <b>8</b>  |
| 5.1.       | Termociclador.....                                                                | 8         |
| 5.2.       | Suporte Magnético .....                                                           | 8         |
| 5.3.       | Instrumento de PCR em Tempo Real.....                                             | 8         |
| 5.4.       | Equipamento Illumina MiSeq .....                                                  | 8         |
| <b>6.</b>  | <b>RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS .....</b>                                     | <b>9</b>  |
| 6.1.       | Precauções .....                                                                  | 9         |
| 6.2.       | Substâncias Interferentes.....                                                    | 9         |
| 6.3.       | Requisitos e Manuseamento de Amostras.....                                        | 9         |
| 6.4.       | Armazenamento de Amostras.....                                                    | 9         |
| <b>7.</b>  | <b>PROCEDIMENTO DE ENSAIO .....</b>                                               | <b>10</b> |
| 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        |
| <b>8.</b>  | <b>ANÁLISE DE DADOS .....</b>                                                     | <b>17</b> |
| <b>9.</b>  | <b>VALORES ESPERADOS .....</b>                                                    | <b>17</b> |
| <b>10.</b> | <b>LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO .....</b>                                           | <b>18</b> |
| <b>11.</b> | <b>INTERPRETAÇÃO E RELATÓRIO .....</b>                                            | <b>18</b> |
| <b>12.</b> | <b>DADOS DE AMOSTRAS.....</b>                                                     | <b>21</b> |
| <b>13.</b> | <b>CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO .....</b>                                        | <b>21</b> |
| <b>14.</b> | <b>GUIA DE RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS.....</b>                                        | <b>22</b> |
| <b>15.</b> | <b>SERVIÇOS TÉCNICOS E APOIO AO CLIENTE.....</b>                                  | <b>23</b> |
| <b>16.</b> | <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>                                                          | <b>23</b> |
| <b>17.</b> | <b>SÍMBOLOS .....</b>                                                             | <b>23</b> |
| <b>18.</b> | <b>AVISO LEGAL.....</b>                                                           | <b>24</b> |
| <b>19.</b> | <b>LYMPHOTRACKDX TRB ASSAY - MISEQ: GUIA DE PÁGINA ÚNICA .....</b>                | <b>25</b> |
| <b>20.</b> | <b>ANEXO A: CRIAR UMA BIBLIOTECA DE SEQUENCIAÇÃO COM MÚLTIPLOS ALVOS NGS.....</b> | <b>26</b> |

## 1. Utilização Pretendida

O Ensaio LymphoTrack Dx *TRB* 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 *TRB* 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 recetor beta de células T humano (*TRB*, anteriormente conhecido por locus do gene *TCRB*) no cromossoma 7 (7q34) inclui 65 segmentos génicos  $V\beta$  (variáveis), seguidos por dois conjuntos separados de genes, cada um com um gene  $D\beta$  (diversidade), vários genes  $J\beta$  (junção) e uma região  $C\beta$  (constante) distribuídas por 685 quilobases. Os genes 2  $C\beta$ , *TRBC1* e *TRBC2* codificam produtos altamente homólogos sem quaisquer diferenças funcionais.

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.<sup>1</sup> Por exemplo, durante o desenvolvimento da célula T, os genes que codificam as moléculas do *TRB* são constituídos a partir de múltiplos segmentos de genes polimórficos que sofrem rearranjos e seleção, gerando combinações  $V\beta-D\beta-J\beta$  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 *TRB* 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 Morley, que são atualmente considerados o método padrão por excelência.<sup>2</sup> 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 LymphoTrackDx *TRB* 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 *TRB* utilizando uma única multiplex master mix e, ao mesmo tempo, identifica a sequência de ADN específica para cada rearranjo génico clonal. Este produto 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 *TRB* visa as regiões conservadas nos segmentos  $V\beta$  e  $J\beta$  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 Ensaio 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.<sup>3</sup>

### 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 *TRB* originam até um máximo de quatro 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  $\log_{10}$  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.**


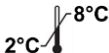


## 4. Reagentes

### 4.1. Componentes dos Reagentes

Tabela 1. Kits Disponíveis

| Ref. Catálogo       | Descrição                              | Número de Master Mixes Indexadas             | Total de Reações |
|---------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------|------------------|
| <b>REF</b> 92250009 | LymphoTrack Dx TRB Assay Kit A – MiSeq | 8 índices – 5 análises de sequenciação cada  | 40               |
| <b>REF</b> 92250019 | LymphoTrack Dx TRB Assay Panel – MiSeq | 24 índices – 5 análises de sequenciação cada | 120              |

Tabela 2. Componentes dos Kits

| Reagente                  | Componentes dos Reagentes          | Quantidade Unitária | 92250009<br>Número de Unidades | 92250019<br>Número de Unidades | Temperatura de Armazenamento                                                                                                                                                         | Notas                                                                                    |
|---------------------------|------------------------------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Master Mixes <sup>‡</sup> | TRB MiSeq 01                       | 225 µL              | 1                              | 1                              |                                                                                                 | N/A                                                                                      |
|                           | TRB MiSeq 02                       |                     | 1                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 03                       |                     | 1                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 04                       |                     | 1                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 05                       |                     | 1                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 06                       |                     | 1                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 07                       |                     | 1                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 08                       |                     | 1                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 09                       |                     | 0                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 10                       |                     | 0                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 11                       |                     | 0                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 12                       |                     | 0                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 13                       |                     | 0                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 14                       |                     | 0                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 15                       |                     | 0                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 16                       |                     | 0                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 18                       |                     | 0                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 19                       |                     | 0                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 20                       |                     | 0                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 21                       |                     | 0                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
|                           | TRB MiSeq 22                       |                     | 0                              | 1                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
| TRB MiSeq 23              | 0                                  | 1                   |                                |                                |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
| TRB MiSeq 25              | 0                                  | 1                   |                                |                                |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
| TRB MiSeq 27              | 0                                  | 1                   |                                |                                |                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |
| ADN de Controlo Positivo  | TRB POS (+)<br><b>REF</b> 40880058 | 45 µL               | 1                              | 3                              | <br>ou<br> | Vβ12-4/ Jβ1-2 ADN diluído em ADN de amígdala faríngea                                    |
| ADN de Controlo Negativo  | NGS NEG (-)<br><b>REF</b> 40920018 | 45 µL               | 1                              | 3                              |                                                                                                 | ADN de amígdala faríngea, a frequência de sequência mais elevada pode variar entre lotes |

**Nota:** Não são utilizados conservantes no fabrico destes kits.

**Nota<sup>‡</sup>:** 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
- Equipamentos sugeridos:
  - 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) ou
  - DynaMag™-96 Side Skirted Magnet\* (Magneto com rebordo 96 DynaMag™\*) da Thermo Fisher Scientific (REF 12027) ou equivalente
- Características de desempenho e especificações:
  - Esferas paramagnéticas de precipitado
- Consulte a secção 7.5 *Purificação com 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  $\mu$ L de ADN de amostra numa concentração mínima de 10 ng/ $\mu$ L).
- 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 obter informações sobre os materiais fornecidos em cada kit.

### 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: <ul style="list-style-type: none"> <li>EagleTaq™ DNA Polymerase (ADN EagleTaq™ polimerase) ou</li> </ul> Invivoscribe: <ul style="list-style-type: none"> <li>FalconTaq DNA Polymerase (ADN FalconTaq polimerase) ou equivalente</li> </ul>                                                                                                                             | 05206944190<br>ou<br>60970130    | 5 U/μL                                                                 |
| Água para biologia molecular            | N/A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | N/A                              | Sem ADNase/ARNase                                                      |
| Pipetas calibradas                      | N/A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | N/A                              | Tem de ser capaz de medir com exatidão 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: <ul style="list-style-type: none"> <li>Agencourt AMPure XP</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                    | A63880                           | N/A                                                                    |
| Purificação de PCR                      | Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> <li>Magnetic Stand 96 (Suporte magnético 96) da Ambion</li> <li>DynaMag-96 Side Skirted Magnet (Magneto com rebordo 96 DynaMag) ou</li> </ul> Beckman Coulter: <ul style="list-style-type: none"> <li>96 Ring Super Magnet Plate (Placa magnética 96 Ring Super) da Agencourt SPRIPlate ou equivalente</li> </ul> | AM10027<br>12027<br>ou<br>A32782 | N/A                                                                    |
| Quantificação de amplicons e biblioteca | KAPA Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Kit KAPA Library Quantification (Quantificação de biblioteca KAPA) – Illumina</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                               | KK4824                           | N/A                                                                    |
| Análise MiSeq                           | Illumina: <ul style="list-style-type: none"> <li>MiSeq Reagent v2 kit (Kit de reagente MiSeq v2) (500 ciclos) ou</li> <li>v3 kit (Kit v3) (600 ciclos) para multiplexação</li> </ul>                                                                                                                                                                                           | MS-102-2003<br>ou<br>MS-102-3003 | Lâmina de fluxo padrão                                                 |
| Software MiSeq                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>MiSeq Software Control (Software de controlo MiSeq) v2.6 ou versão mais recente</li> <li>Local Run Manager v2.0 ou versão mais recente</li> </ul>                                                                                                                                                                                       | 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 aliqüotadas.
- 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         |
| <b>Volume Total</b>        | <b>50,2 µL</b> |

### 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 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.

No caso de multiplexação de vários alvos, 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 =  $n \times 35 \mu\text{L}$  (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 **35  $\mu\text{L}$**  de reagente Agencourt AMPure XP aliquotado, 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 ou num Magnetic Stand-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  $\mu\text{L}$ , aspire o sobrenadante limpo e elimine-o.
- Utilize uma pipeta P10 (ou pipeta multicanal equivalente) calibrada para 10  $\mu\text{L}$  para remover qualquer sobrenadante em excesso.
  - Evite remover quaisquer partículas magnéticas.

### Lavagem:

- 7.5.7. Mantendo a placa no suporte magnético, adicione 200  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ , aspire o etanol e elimine-o.
  - Utilize uma pipeta P10 (ou pipeta multicanal equivalente) calibrada para 10  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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).

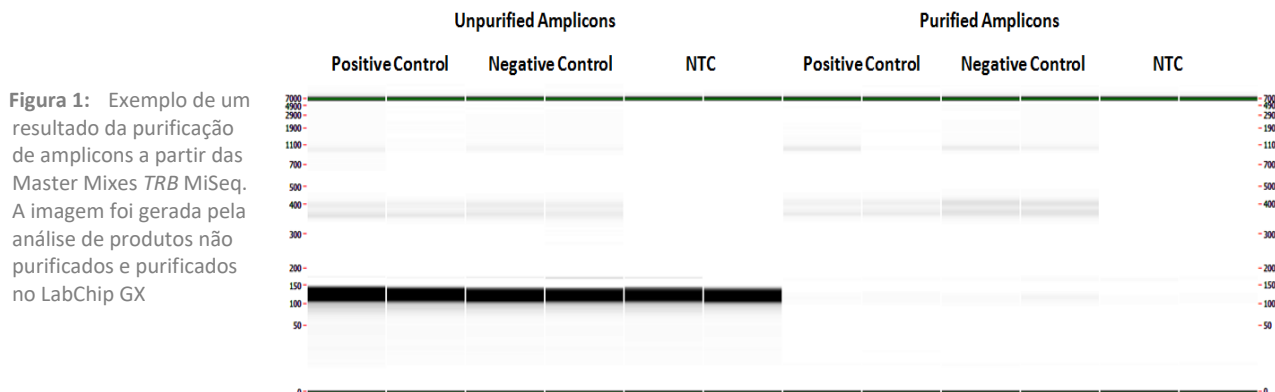


Figura 1: Exemplo de um resultado da purificação de amplicons a partir das Master Mixes TRB MiSeq. A imagem foi gerada pela análise de produtos não purificados e purificados no LabChip GX

### 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         |
| <b>Volume Total</b>                                   | <b>20,0 µL</b> |

- 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 controlos (positivo e negativo) e o NTC, utilizando a seguinte equação:

$$\Delta Ct = Ct (NTC) - Ct (\text{Controlo})$$

Se  $\Delta Ct \geq 3,0$  para ambos os controlos, avance para a etapa seguinte. Se  $\Delta Ct < 3,0$  para um dos controlos, 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  $\Delta Ct$  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 **TRB** é de 400 bp (**A = 400**).

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 – MiSeqDx.

## 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  $\mu\text{L}$  utilizando o Tampão de diluição A como diluente. Combine 10  $\mu\text{L}$  de cada amplicon de 4 nM.
  - Para amostras com uma concentração  $< 4$  nM, adicione a quantidade máxima de amostra possível (10  $\mu\text{L}$ ) e não adicione Tampão de diluição A a essa amostra.
- 7.7.2. Misture cuidadosamente em vórtex e, em seguida, centrifugue por breves instantes.

## 7.8. Diluição da Biblioteca Agrupada

1:1000 Final:

**Etapa A:** 2  $\mu\text{L}$  de biblioteca agrupada + 198  $\mu\text{L}$  de Tampão de diluição A.  
Misture bem pipetando para cima e para baixo 10 vezes.

**Etapa B:** 20  $\mu\text{L}$  da Etapa A + 180  $\mu\text{L}$  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 da 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 **TRB** é de 400 bp (**A = 400**).

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 – MiSeqDx.

## 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 **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 MiSeq numa única biblioteca, consulte o Anexo A.

- 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        |
| <b>Volume Total</b> | <b>20 µL</b> |

- 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         |
| <b>Volume Total</b>    | <b>1000 µL</b> |

- 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 siga 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 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 (a concentração inicial era 4 nM), dilua a biblioteca para a concentração de carregamento pretendida no MiSeq utilizando os exemplos na Tabela 10:

**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                                                                                                                       |



**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)] |
|------------------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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 12.

**Tabela 12.** Tempos de Análise MiSeq

| MiSeq Reagent Kit (Kit de Reagente MiSeq) | Duração da Leitura | Versão MCS                  | Tempo de Análise MiSeq Total |
|-------------------------------------------|--------------------|-----------------------------|------------------------------|
| v2                                        | 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 *TRB* 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 sua encomenda. 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 *TRB*  $\geq 2,5\%$
- % de primeiras leituras do controlo negativo NGS  $< 1,0\%$
- \*Validade da análise MiSeq:
  - %Q30  $\geq 75\%$  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 também 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.
- 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.
- 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 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 seqüências 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

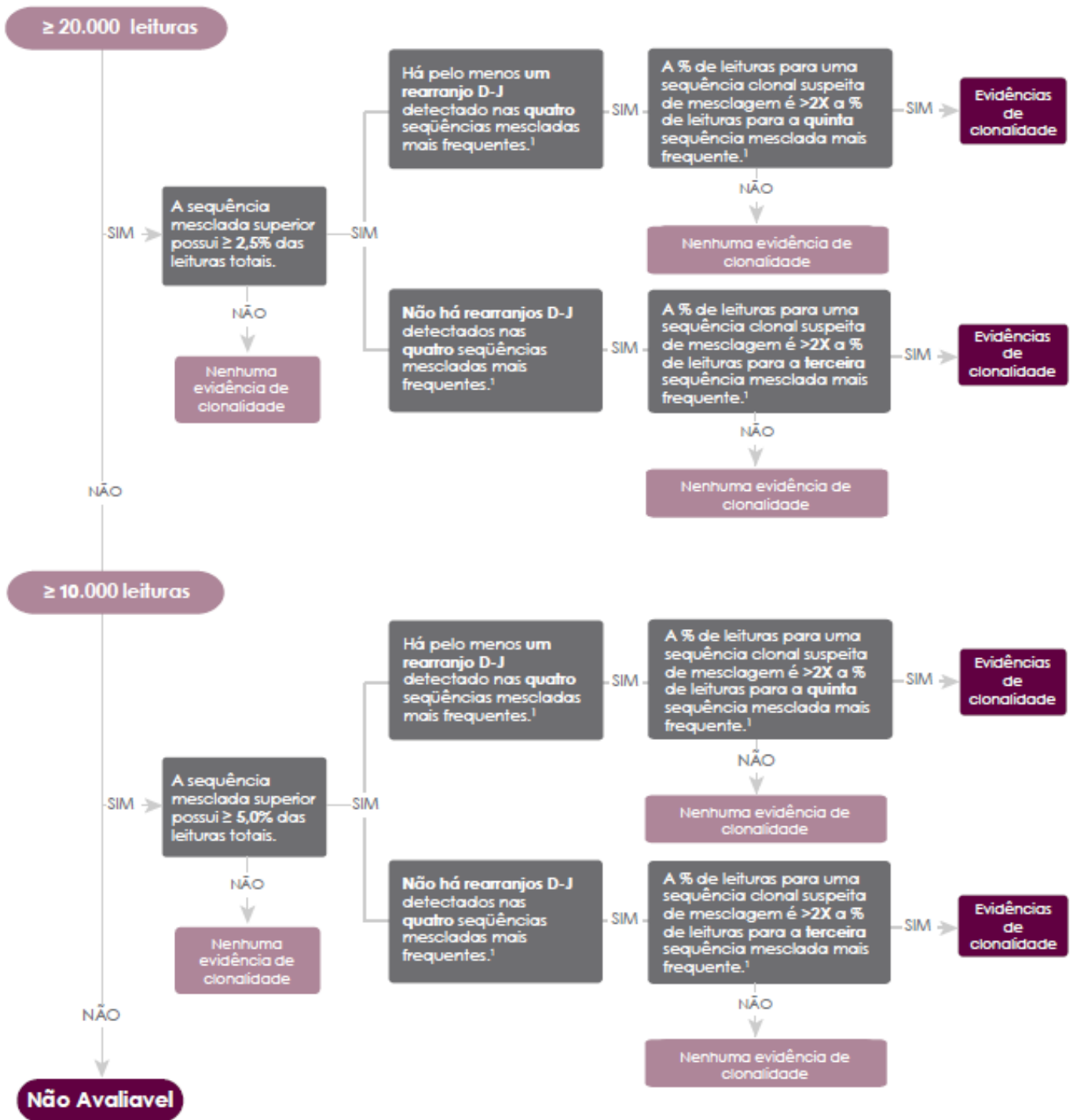
| Critério 1                                                | Critério 2                                                          | Critério 3                                                                                                  | Critério 4                                                                                                                                             | Chamada                               |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| O número total de leituras por amostra é $\geq 20\ 000$ . | A primeira seqüência fundida tem $\geq 2,5\%$ do total de leituras. | Existe, <b>pelo menos, um rearranjo D-J</b> detetado nas <b>quatro</b> seqüências fundidas mais frequentes. | A % de leituras para uma seqüência fundida clonal suspeita é $> 2X$ a % de leituras para a <b>5ª</b> seqüência fundida mais frequente. <sup>1</sup>    | EVIDÊNCIA DE CLONALIDADE DETETADA     |
|                                                           |                                                                     |                                                                                                             | A % de leituras para uma seqüência fundida clonal suspeita é $\leq 2X$ a % de leituras para a <b>5ª</b> seqüência fundida mais frequente. <sup>1</sup> | Sem evidência de clonalidade detetada |
|                                                           |                                                                     | Não existe <b>qualquer rearranjo D-J</b> detetado nas <b>quatro</b> seqüências fundidas mais frequentes.    | A % de leituras para uma seqüência fundida clonal suspeita é $> 2X$ a % de leituras para a <b>3ª</b> seqüência fundida mais frequente. <sup>1</sup>    | EVIDÊNCIA DE CLONALIDADE DETETADA     |
|                                                           |                                                                     |                                                                                                             | A % de leituras para uma seqüência fundida clonal suspeita é $\leq 2X$ a % de leituras para a <b>3ª</b> seqüência fundida mais frequente. <sup>1</sup> | Sem evidência de clonalidade detetada |

Tabela 13. Critérios de Interpretação

| Critério 1                                                             | Critério 2                                                          | Critério 3                                                                                                  | Critério 4                                                                                                                                       | Chamada                               |
|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| O número total de leituras por amostra é <b>≥10 000 e &lt;20 000</b> . | A primeira sequência fundida tem <b>≥5,0%</b> do total de leituras. | Existe, <b>pelo menos, um rearranjo D-J</b> detetado nas <b>quatro</b> sequências fundidas mais frequentes. | A % de leituras para uma sequência fundida clonal suspeita é >2X a % de leituras para a <b>5ª</b> sequência fundida mais frequente. <sup>1</sup> | EVIDÊNCIA DE CLONALIDADE DETETADA     |
|                                                                        |                                                                     |                                                                                                             | A % de leituras para uma sequência fundida clonal suspeita é ≤2X a % de leituras para a <b>5ª</b> sequência fundida mais frequente. <sup>1</sup> | Sem evidência de clonalidade detetada |
|                                                                        |                                                                     | Não existe <b>qualquer rearranjo D-J</b> detetado nas <b>quatro</b> sequências fundidas mais frequentes.    | A % de leituras para uma sequência fundida clonal suspeita é >2X a % de leituras para a <b>3ª</b> sequência fundida mais frequente. <sup>1</sup> | EVIDÊNCIA DE CLONALIDADE DETETADA     |
|                                                                        |                                                                     |                                                                                                             | A % de leituras para uma sequência fundida clonal suspeita é ≤2X a % de leituras para a <b>3ª</b> sequência fundida mais frequente. <sup>1</sup> | Sem evidência de clonalidade detetada |
| O número total de leituras por amostra é <b>&lt;10 000</b> .           | N/A                                                                 | N/A                                                                                                         | N/A                                                                                                                                              | Não avaliável                         |

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

## Número de leituras de sequenciamento para uma amostra



<sup>1</sup>Os cálculos gerados pelo software são arredondados para o décimo mais próximo para comparação.

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

## 12. Dados de Amostras

### LymphoTrack Dx Report for assay TRB

Sample name: TRB\_positive\_S2\_L001\_001\_combined

Total Read Count: 236719

IndexQ30: 93

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    | GAGTTGCTCATTACTTT  | 198    | 30094       | Vb12-4 | Jb1-2  | 12.71         | 12.71        | GCCAGCAGTTTCTCGAC |
| 2    | GGAGGTGAGAAGGAAG   | 221    | 6457        | Db1    | Jb1-3  | 2.73          | 15.44        | not found         |
| 3    | CCTTCCCATTTTAATTCA | 193    | 426         | Db2    | Jb2-7  | 0.18          | 15.62        | not found         |
| 4    | CCTTCCCATTTTAATTCA | 246    | 271         | Db2    | Jb2-5  | 0.11          | 15.74        | not found         |
| 5    | CCTTCCCATTTTAATTCA | 197    | 232         | Db2    | Jb2-2  | 0.10          | 15.83        | not found         |
| 6    | CCTTCCCATTTTAATTCA | 238    | 136         | Db2    | Jb2-5  | 0.06          | 15.89        | not found         |
| 7    | CATGACAAAATGACTG   | 235    | 95          | Vb25-1 | Jb1-2  | 0.04          | 15.93        | not found         |
| 8    | CATGACAAAATGACTG   | 240    | 94          | Vb25-1 | Jb1-2  | 0.04          | 15.97        | GCCAGCAGTGAGGAGA  |
| 9    | CCTTCCCATTTTAATTCA | 187    | 83          | Db2    | Jb2-7  | 0.04          | 16.01        | not found         |
| 10   | CCTTCCCATTTTAATTCA | 200    | 81          | Db2    | Jb2-7  | 0.03          | 16.04        | 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 seqüências foram geradas utilizando o LymphoTrack Dx TRB Assay – MiSeq e analisadas com o LymphoTrack Dx Software – MiSeq (REF 95000009).

## 13. Características de Desempenho

Os resultados do LymphoTrack Dx TRB Assay – MiSeq foram comparados com o Identiclone TCRB Gene Clonality Assay (Método de controle) e a concordância (ou concordância percentual global), a concordância percentual positiva (PPA) e a concordância percentual negativa (NPA) foram: 84,1% (37/44 casos), 70,8% e 100%, respectivamente.

Tabela 14. Comparação entre o LymphoTrack Dx TRB Assay – MiSeq e o Identiclone TCRB Gene Clonality Assay (Método de controle)

|                                  |            | Identiclone TCRB Gene Clonality Assay (Método de controle) |            |
|----------------------------------|------------|------------------------------------------------------------|------------|
|                                  |            | Clonal                                                     | Não Clonal |
| LymphoTrack Dx TRB Assay - MiSeq | Clonal     | 17                                                         | 0          |
|                                  | Não Clonal | 7                                                          | 20         |

O desempenho analítico do LymphoTrack Dx TRB 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 detecção (LoD) foi observado em ADN diluído a 5%. A % mais alta de leituras de ADN da amígdala faríngea foi <1%. A regressão linear R<sup>2</sup> foi >0,97 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 20% 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<br><br><b>(REF)</b> 20960021 para deteção ABI ou<br><b>(REF)</b> 20960020 para deteção em gel)                      |
| Quantificação de amplicons utilizando o kit KAPA library quantification (Quantificação de biblioteca KAPA) | $\Delta Ct < 3,0$<br>$\Delta Ct = Ct (NTC) - Ct (Controlo)$                                       | Verifique o NTC no Bioanalisador/LabChip GX quanto a contaminação na região alvo (300-500 bp) utilizando a correção de linha de base. Se não existir produto na região alvo (300-500 bp), avance para a etapa seguinte, caso contrário, repita o ensaio. |
| 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                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Análise MiSeq                                                                                              | %Q30 <75% para v2 (2x251)*<br>%Q30 <70% para v3 (2x301)*                                          | Contacte o Apoio Técnico da Invivoscribe +1-858-224-6600                                                                                                                                                                                                 |
|                                                                                                            | 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)                                                                                   | NTC mostra amplificação após PCR na região alvo (300-500 bp) no Bioanalisador/LabChip GX após 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 *TRB* 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](mailto:support@invivoscribe.com) | Apoio ao Cliente: [sales@invivoscribe.com](mailto:sales@invivoscribe.com) | Website: [www.invivoscribe.com](http://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* (2<sup>nd</sup> Ed., sections 30.2.7.13 and 30.2.7.18). New York, EUA: Springer Science & Business Media.
- 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.

|                                                                                     |                                        |                                                                                     |                                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
|  | Referência do catálogo                 |  | Data de validade                           |
|  | Volume de reagente                     |  | Representante autorizado na União Europeia |
|  | Número de lote                         |  | Consulte as instruções de utilização       |
|  | Condições de armazenamento             |  | Para utilização em diagnóstico in vitro    |
|  | Identificador de Dispositivo Exclusivo |  | Fabricante                                 |
|  | Conformidade do Reino Unido Avaliada   |  | Pessoa responsável no Reino Unido          |
|  | Representante Autorizado Suíço         |  | 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 7,785,783, Patente dos EUA número 8,859,748 (juntamente com as reivindicações do pedido divisionário relativas ao registo original), Patente europeia número EP 1549764B1 (válida em 16 países e estendida por Patentes europeias relacionadas com os números EP2418287A3 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.

Illumina® e MiSeq™ são marcas registadas da Illumina, Inc.

Beckman Coulter®, Agencourt®, AMPure® e SPRIPLATE® são marcas registadas da Beckman Coulter, Inc.

Roche® é uma marca registada e EagleTaq™ é uma marca comercial da Roche.

Verti®, SYBR®, Ambion®, Applied BioSystems® e Life Technologies® são marcas registadas da Thermo Fisher Scientific e respetivas subsidiárias.

KAPA™ é uma marca comercial da Kapa Biosystems.

Microsoft®, Windows® e Excel® são marcas registadas da Microsoft Corporation.



## 19. LymphoTrackDx TRB 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 **35 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 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 registar 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** Definições dos Ciclos e Kits de Reagente para uma Análise MiSeq de Alvo Único

| Procedimento Etapa | Descrição                                                                                                                   | LymphoTrack Dx Assay - MiSeq |                      |                      |                      |                      |                      |                      |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                    |                                                                                                                             | Líder <i>IGHV</i>            | <i>IGH FR1</i>       | <i>IGH FR2</i>       | <i>IGH FR3</i>       | <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<br>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<br>(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)<br>v2 (500) | v2 (500)             | v2 (300)<br>v2 (500) | v2 (500)             |
| 7.12               | Definições da folha de amostras para:<br>Cycles Read 1*<br>(Leitura do ciclo 1*)<br>Cycles Read 2*<br>(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 (Kit de Reagente MiSeq)                                         | Concentração de Carregamento   | Ref. Catálogo                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Apenas <i>IGH FR3</i> e <i>TRG</i> em conjunto                                                                                           | 151 cycles Read 1 (Leitura do ciclo 1)<br>151 cycles Read 2 (Leitura do ciclo 2) | v2 kit (Kit v2) (300 ciclos)<br>ou<br>v2 kit (Kit v2) (500 ciclos)                | 12 pM (v2)<br>ou<br>20 pM (v3) | MS-102-2002<br>ou<br>MS-102-2003 |
| Qualquer combinação destes alvos em conjunto:<br><i>IGH FR1</i> , <i>IGH FR2</i> , <i>IGH FR3</i> , <i>IGK</i> , <i>TRB</i> e <i>TRG</i> | 251 cycles Read 1 (Leitura do ciclo 1)<br>251 cycles Read 2 (Leitura do ciclo 2) | v2 kit (Kit v2) (500 ciclos)<br>até 4 alvos<br>ou<br>v3 kit (Kit v3) (600 ciclos) | 12 pM (v2)<br>ou<br>20 pM (v3) | MS-102-2003<br>ou<br>MS-102-3003 |
| Ao combinar qualquer um dos ensaios com o Líder <i>IGHV</i>                                                                              | 301 cycles Read 1 (Leitura do ciclo 1)<br>301 cycles Read 2 (Leitura do ciclo 2) | v3 kit (Kit v3) (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  $\mu\text{L}$ .

|   |   |                                                                         |
|---|---|-------------------------------------------------------------------------|
| 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  $\mu\text{L}$  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 ( $\mu\text{L}$ ) |               |               |               |               |               |               |
|-------------------|-------------------|---------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Nome do Ensaio    | Concentração (nM) |                                                   | Caso A<br>n=7 | Caso B<br>n=6 | Caso C<br>n=5 | Caso D<br>n=4 | Caso E<br>n=3 | Caso F<br>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. Desnatura 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  $\mu\text{L}$  à reação desnaturada, conforme apresentado na tabela que se segue.

**Tabela 19.** Desnaturação da Biblioteca

| Reagente                              | Volume ( $\mu\text{L}$ ) |
|---------------------------------------|--------------------------|
| 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)     |
| <b>Total</b>                          | <b>20</b>                |

Misture cuidadosamente 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         |
| <b>Total</b>           | <b>1000 µL</b> | <b>1000 µL</b> |

**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.