



LymphoSign



GENEXPATH LymphoSign Manual de Utilizador

Precauções do utilizador.



Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* de acordo com a Diretiva (UE) 98/79/CE



Para utilização *em diagnóstico in vitro*

Destina-se apenas a utilização profissional.

Leia todas as informações contidas neste manual de Utilizador antes de usar.

Contactos:

Fabricante: GENEXPATH

+33 (0)2.78.08.98.69

113 avenue des Martyrs de la Résistance

76100 Rouen - França

contact@genexpath.com

support@genexpath.com



Precauções importantes.....	5
Recomendações gerais.	5
Ícones.....	5
Utilização prevista.	6
Princípio do teste.	6
Reagentes.	7
Conteúdo do kit de reagentes GENEXPATH LymphoSign.	7
Formato dos kits de reagentes vendidos e quantidades:.....	8
Reagentes não fornecidos no kit de reagentes:	8
Equipamento necessário:.....	9
Antes de começar.	9
Amostras biológicas.	10
Soluções para preparar.....	10
Programação dos termocicladores.	10
Programa 1: Pré-PCR.	11
Programa 2: PCR.....	11
Protocolo pormenorizado.	11
Passo 1: Transcrição inversa.	12
Reagentes necessários.	12
Passo 1.a: Transcrição inversa; desnaturação do ARN e hibridação de hexâmeros aleatórios.....	12
Passo 1.b: Transcrição inversa; conversão do ARN em ADNc.....	13
Passo 2: Hibridação das sondas.	13
Reagentes necessários.	13
Hibridação de sondas.	13
Passo 3: Ligação.	14
Reagentes necessários.	14
Ligação.....	14
Passo 4: Amplificação e incorporação de códigos de barras e adaptadores.....	15

Reagentes necessários.	15
Amplificação.	15
Passo 5: Purificação e ensaio das bibliotecas de sequenciação.	16
Reagentes necessários.	16
Passo 5.a: Purificação das bibliotecas de sequenciação.	16
Passo 5.b: Ensaio de bibliotecas de sequenciação:.....	16
Passo 6: Diluição, agrupamento e sequenciação das bibliotecas.....	16
Reagentes necessários.	17
Sequenciação num sequenciador Illumina MiSeq.	17
• Passo 6.a: Diluição e agrupamento das bibliotecas.	17
• Passo 6.b: Desnaturação e diluição do pool de bibliotecas.	17
• Passo 6.c: Preparação do primer de sequenciação.....	17
• Passo 6.d: Preparação da folha de injeção.....	18
• Passo 6.e: Início da sequenciação.	18
Sequenciação numa plataforma Illumina NextSeq 500/550.	18
• Passo 6.a: Diluição e agrupamento das bibliotecas.	18
• Passo 6.b: Desnaturação e diluição do pool de bibliotecas.	19
• Passo 6.c: Preparação do primer de sequenciação.....	19
• Passo 6.d: Preparação da folha de injeção.....	19
• Passo 6.e: Início da sequenciação.	19
Passo 7: Análise dos resultados.	20
Limites do procedimento.....	20
Desempenho analítico.....	21
Repetibilidade.....	21
Interoperabilidade.....	22
Reprodutibilidade.....	22
Bibliografia.....	23
Tabela de símbolos.....	23
Notas.....	24

Precauções importantes.

Recomendações gerais.

- Utilizável para utilização *em diagnóstico in vitro*
- Seguir as melhores práticas laboratoriais em termos de manuseamento de produtos PCR (usar fatos-macaco e luvas descartáveis, marcar zonas dedicadas para pré e pós-PCR, utilizar pontas de filtro).
- Tomar também precauções para evitar a contaminação por nucleases que causam a degradação do ARN e do ADN (utilizar reagentes e consumíveis isentos de nucleases).
- Assegurar que os termocicladores estão em condições de funcionamento e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.
- É particularmente importante não substituir reagentes não incluídos no kit, em especial tampões e enzimas utilizados durante as etapas de transcrição inversa, ligação e amplificação da PCR. As temperaturas e os tempos de incubação, bem como os volumes e as concentrações, também devem ser respeitados.
- Os reagents do kit **GENEXPATH LymphoSign** destinam-se apenas a ser utilizados com as plataformas de sequenciação MiSeq ou NextSeq 500/550 da Illumina.
- As fichas de dados de segurança estão disponíveis no espaço do utilizador.
- Se o utilizador detetar erros no manual de instruções: envie uma mensagem de correio eletrónico para [.contact@genexpath.com](mailto:contact@genexpath.com)
- Qualquer incidente grave relacionado com o dispositivo deve ser-nos comunicado através do endereço contact@genexpath.com.

Ícones



Pontos importantes e passos críticos do protocolo que podem comprometer a qualidade dos resultados.



Passos em que o protocolo pode ser suspenso.

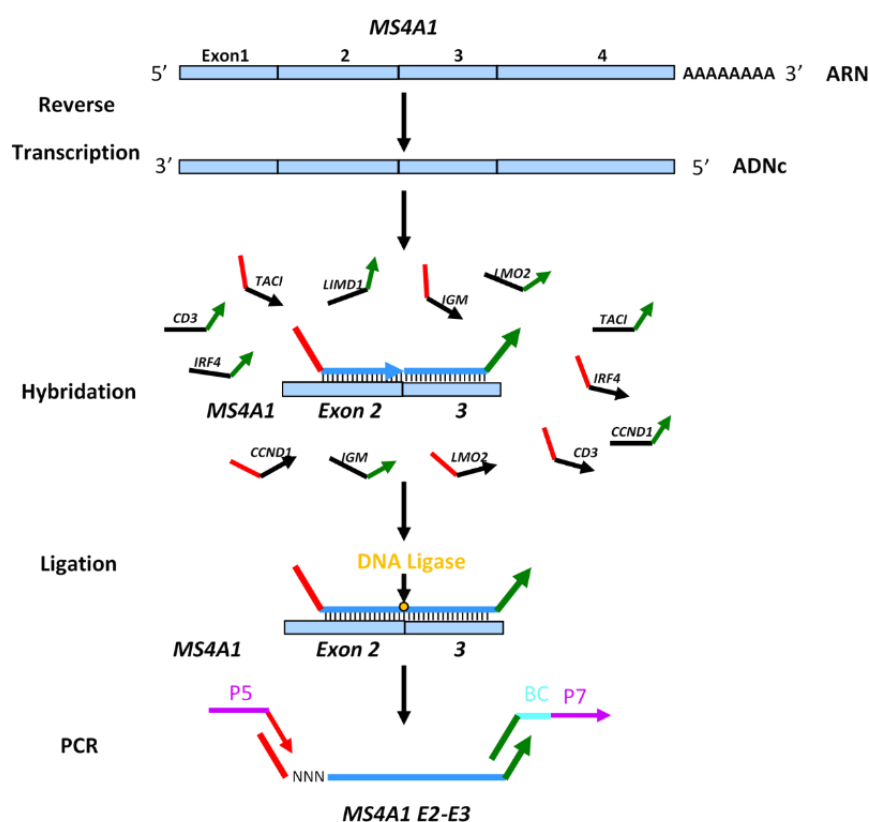
Utilização prevista.

Este protocolo destina-se aos testes **GENEXPATH LymphoSign**. Okit é utilizado para preparar bibliotecas de sequenciação para os sequenciadores MiSeq ou NextSeq 500/550 da Illumina.

Os ficheiros fastQ gerados com este teste contêm dados sobre os níveis de expressão de mais de 130 genes e marcadores genéticos. São analisados através da plataforma **GENEXPATH RT-MIS**, que contém uma aplicação específica de desmultiplexagem de sequências, bem como um algoritmo de Inteligência Artificial que compara os perfis de expressão obtidos com os dos principais tipos de linfoma Não Hodgkin.

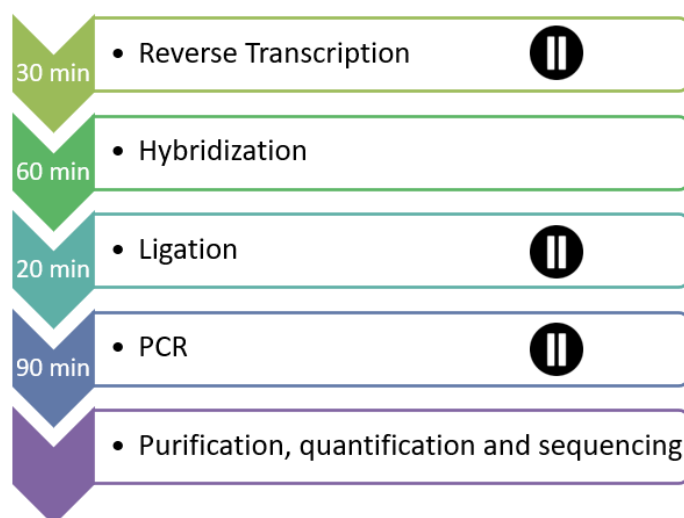
Princípio do teste.

O teste **GENEXPATH LymphoSign** utiliza um método de RT-PCR dependente de ligação (LD-RT-PCR). Esta técnica semi-quantitativa ajuda a avaliar simultaneamente os níveis de expressão de um grande número de marcadores genéticos, tais como genes, mutações somáticas ou translocações cromossómicas, utilizando pares de sondas de oligonucleótidos específicos para cada um destes marcadores.



Quatro passos são suficientes para obter bibliotecas a partir de uma extração total de ARN.

- Um passo de transcrição inversa (RT).
- Um passo de hibridização de sondas oligonucleotídicas específicas.
- Um passo de ligação.
- Um passo de amplificação por PCR.



Não é necessária qualquer purificação até à obtenção das bibliotecas, o que limita as perdas de material e garante uma excelente sensibilidade desta técnica. Além disso, as sequências de genes visadas pelas sondas são particularmente curtas (entre 40 e 60 bases), o que garante uma excelente robustez no que respeita à degradação do ARN.

A LD-RT-PCR é, por conseguinte, uma abordagem particularmente adequada para a análise de amostras biológicas difíceis, como biópsias de tecidos fixadas e incluídas em parafina.

Para cada amostra, cerca de 10^5 sequências são suficientes para obter um perfil de expressão analisável, o que ajuda a testar um grande número de amostras simultaneamente na mesma corrida de sequenciação. Para otimizar os custos, as bibliotecas **GENEXPATH LymphoSign** podem também ser carregadas ao mesmo tempo que outras bibliotecas de sequenciação, geradas por outros métodos.

Reagentes.

Conteúdo do kit de reagentes GENEXPATH LymphoSign.

Mistura de sondas **GENEXPATH LymphoSign** GEP-LSPM



Códigos de barras **GENEXPATH LymphoSign** GEP-BC-xxx

Primer de sequenciação **GENEXPATH LymphoSign** GEP-SP-001

XXX: número do código de barras

Após a receção, estes reagentes devem ser armazenados entre -25°C e -15°C.

Estão prontos a utilizar e não necessitam de ser diluídos.

O prazo de validade dos reagentes é de 1 ano.

Devolver às condições de armazenamento imediatamente após a utilização.

Não utilizar reagentes após o prazo de validade indicado no rótulo.

Formato dos kits de reagentes vendidos e quantidades:

	Kit de reagentes - U = número de análises			
	8U	16U	24U	48U
Mistura de sondas GEP-LSPM	30 µL	48 µl	54 µl	108 µL
Códigos de barras GEP-BC-xxx (de 001 a 032 consoante o número de análises adquiridas) BC=código de barras	8 BC	8 BC	12 BC	24 A.C.
	N°001 a 008	N°017 a 024	N°001 a 012	N°009 a 032
	5µL/BC	9µL/BC	9µL/BC	9µL/BC
Primers de sequenciação GEP-SP-001	60 µL	96 µL	144 µL	288 µL

Os reagentes são fornecidos em quantidades superiores às efetivamente necessárias. Após a realização do número de análises encomendadas, devem ser deitados fora. Se for efectuada uma nova encomenda, serão fornecidos novos reagentes.

Para um kit de reagentes com mais de 8 análises, cada código de barras será utilizado para 2 análises diferentes.

Reagentes não fornecidos no kit de reagentes:

Reagentes	Fornecedores e referências
Invitrogen™ M-MLV Transcriptase Reversa (200U/µL)	Fisher Scientific, ref. 10338842

Invitrogen™ conjunto de dNTPs (100mM)	Fisher Scientific, ref. 10083252
Invitrogen™ Primers aleatórios	Fisher Scientific, ref. 10646313
Tampão SALSA MLPA (180 µL)	MRC Holland, ref. SMR33
Tampão A da ligase SALSA (360 µL)	MRC Holland, ref. SMR12
Tampão B da ligase SALSA (360 µL)	MRC Holland, ref. SMR13
SALSA Ligase-65 (115 µL)	MRC Holanda, ref. SMR20
Mistura principal Q5® Hot Start de alta fidelidade 2X	New England BioLabs, ref. M0494
AMPure XP (esferas magnéticas)	Beckman Coulter, ref A63880
Kit de ensaio Qubit® dsDNA HS	Fisher Scientific, ref. 10616763
Reagentes de sequenciação	Illumina
Tampão TE (10 mM Tris-Acetato pH 8,0, 1 mM EDTA)	Variável
Etanol 100%	Variável
NaOH 1 N	Variável
Tampão Tris 200 mM pH 7	Variável
Água sem nuclease	Variável

Aquando da receção e entre cada utilização, estes reagentes devem ser armazenados com base nas recomendações do fornecedor.

Equipamento necessário:

Equipamento	Fornecedores e referências
Termociclador na zona de pré-PCR	Variável
Termociclador na zona pós-PCR	Variável
Fluorómetro Qubit® (ou equivalente)	Thermo Fisher Scientific, ref. Q33238
Tubos de ensaio Qubit	Fisher Scientific, ref. 12037609
Íman lateral DynaMag™-96 - Placa magnética (purificação AMPure XP)	Thermo Fisher Scientific, ref. 12331D
Placas e tubos PCR 200 µL	Variável

Antes de começar.



Amostras biológicas.

O teste **GENEXPATH LymphoSign** é utilizado para preparar bibliotecas de sequenciação a partir de extracções de ARN total de biópsias tumorais ou de linhas celulares humanas. Este teste só é aplicável a linfomas não-Hodgkin.

Estas amostras podem ser frescas, congeladas ou fixadas em formalina e incluídas em parafina (FFPE).

Para extrair o ARN de tecidos fixados, recomendamos a utilização do kit Promega Maxwell® RSC RNA FFPE (Promega, ref. AS1440 e AS4500).

A quantidade de ARN a analisar deve situar-se **entre 50 e 500 ng, num volume de 2 µL**. Se a concentração das soluções a analisar for demasiado elevada, este ARN pode ser diluído em água sem nuclease.

Soluções a preparar.

- Hexamers aleatórios (Random Primers, Fisher Scientific, ref 10646313).
Concentração da solução de trabalho: 100 µM
- Diluir 100 µL da solução inicial (a 3 µg/µL) adicionando 1487 µL de água sem nuclease.
- Aliquotar e armazenar entre -25°C e -15°C.
- dNTPs (conjunto de dNTPs, Fisher Scientific, ref. 10083252).
Concentração da solução de trabalho: 10 mM
- Misturar as 4 soluções-mãe (250 µL cada) e diluir adicionando 1,5 ml de água sem nuclease.
- Aliquotar e armazenar entre -25°C e -15°C.

Programação dos termocicladores.

Para limitar os riscos de contaminação, utilizar dois termocicladores, um na zona pré-PCR e outro na zona pós-PCR.

São necessários dois programas:

- A primeira destina-se às três primeiras etapas do protocolo: **transcrição inversa do ARN para cADN, hibridação das sondas de oligonucleótidos e ligação**. Deve ser executado no termociclador localizado na zona de pré-PCR.

- A segunda é utilizada para **amplificar os produtos de ligação e incorporar os códigos de barras e adaptadores necessários para a sequenciação**. Deve ser efectuada no termociclador situado na zona pós-PCR.

Programa 1: Pré-PCR.



Como os volumes de reação são pequenos, assegurar que a temperatura da tampa aquecida do termociclador se mantém elevada (95°C) em todas as etapas do programa para evitar a evaporação.

São previstas pausas a 4°C entre os diferentes passos do programa para adicionar os reagentes necessários.

Passo 1: Transcrição inversa.

Passo 1a: Desnaturação do ARN e hibridação dos hexâmeros.

- Tampa aquecida: 95°C
- 2 Minutos 80°C
- 5 minutos 37°C
- 4°C infinito

Passo 1b: Transcrição inversa do ARN para cADN.

- Tampa aquecida: 95°C
- 15 minutos 37°C
- 2 minutos 98°C
- 4°C infinito

Passo 2: Hibridação das sondas.

- Tampa aquecida: 95°C
- 2 minutos 95°C
- 60°C infinito (1 hora de hibridação)

Passo 3: Ligação.

- Tampa aquecida: 95°C
- 54°C infinito (distribuição da mistura de ligação)
- 15 minutos 54°C
- 5 minutos 98°C
- 4°C infinito

Programa 2: PCR.

- Tampa aquecida: 95°C
- 6 minutos 94°C
- 35 x (30 segundos 94°C; 30 segundos 58°C; 30 segundos 72°C)
- 4 minutos 72°C
- 4°C infinito

Protocolo pormenorizado.

Passo 1: Transcrição inversa.

Este passo deve ser efectuado na zona pré-PCR.

Reagentes necessários.

- dNTPs 10 mM, hexâmeros aleatórios 100 μ M, kit M-MLV RT (tampão de transcrição inversa 5 x, DTT 100 mM, enzima M-MLV RT), extração de ARN total para teste (25 a 250 ng/ μ L).



Recomenda-se a realização de todo o procedimento em placas ou tubos PCR de 200 μ L.

Passo 1.a: Transcrição inversa; desnaturação do ARN e hibridação de hexâmeros aleatórios.

- Descongelar os seguintes reagentes e mantê-los em gelo ou numa grelha de arrefecimento:
 - o Tampão de transcrição inversa 5 x
 - o DTT 100 mM
 - o dNTPs 10 mM
 - o Hexamers 100 μ M
- Preparar uma mistura de transcrição inversa. Para cada amostra, misturar (para um volume total de 3,75 μ L por reação):
 - o Tampão de transcrição inversa 1,25 μ L
 - o DTT 0,5 μ L
 - o dNTPs 1 μ L
 - o Hexameros 1 μ L
- Distribuir esta mistura em tubos PCR de 200 μ L (3,75 μ L por tubo) mantidos em gelo ou num suporte de arrefecimento:
- Adicionar 2 μ L de cada uma das soluções de ARN total (50 a 500 ng) aos diferentes tubos.
- Agitar em vórtice e centrifugar brevemente.
- Colocar os tubos no termociclador na zona de pré-PCR e proceder ao **passo 1.a do programa Pre-PCR** (desnaturação e hibridação dos hexâmeros).

Passo 1.b: Transcrição inversa; conversão do ARN em ADNc.

- No final da etapa 1a, quando a temperatura do termociclador tiver descido para 4°C, centrifugue brevemente os tubos e coloque-os em gelo ou num suporte de arrefecimento.
- Adicionar 0,5 µL de transcriptase reversa (M-MLV RT) a cada tubo.
- Centrifugar brevemente.
- Voltar a colocar os tubos no termociclador.
- Verificar a temperatura da tampa aquecida (95°C).
- Passar ao **passo 1.b do programa de pré-PCR** (transcrição inversa do ARN para ADNc).



Em seguida, avançar diretamente para a etapa 2, ou manter os produtos de ligação entre -25°C e -15°C.

Passo 2: Hibridação das sondas.

Este passo deve ser efectuado na zona pré-PCR.

Reagentes necessários.

- Mistura de sondas **GENEXPATH LymphoSign** (GEP-LSPM), Tampão SALSA MLPA.

Hibridação de sondas.

- **No final do passo 1b**, quando a temperatura do termociclador tiver descido para 4°C, retire os tubos, centrifugue-os brevemente e coloque-os em gelo ou num suporte de arrefecimento.
- Descongelar o tampão Salsa MLPA e a mistura de sondas **GENEXPATH LymphoSign** e, em seguida, mantê-los em gelo ou num suporte de arrefecimento.
- Preparar uma mistura de hibridação. Para cada amostra, misturar (para um volume total de 3 µL por reação):
 - Tampão Salsa MLPA 1,5 µL
 - Mistura de sondas **GENEXPATH LymphoSign** 1,5 µL
- Agitar em vórtice e centrifugar brevemente.
- Adicionar 3 µL desta mistura a cada tubo de cDNA.
- Centrifugar brevemente.

- Voltar a colocar os tubos no termociclador.
- Verificar a temperatura da tampa aquecida (95°C).
- Avançar para o **passo 2 do programa pré-PCR** (hibridação das sondas).


Passo 3: Ligação.

Este passo deve ser efectuado na zona pré-PCR.

Reagentes necessários.

Tampão SALSA Ligase A, Tampão SALSA Ligase B, SALSA Ligase 65, água sem nuclease.

Ligação.

- 15 minutos antes do final da etapa 2a, descongelar o tampão SALSA Ligase A e o tampão SALSA Ligase B e mantê-los em gelo ou numa grelha de arrefecimento.
 - Colocar a enzima Salsa Ligase 65 em gelo ou numa grelha de arrefecimento.
 - Preparar uma mistura de ligação. Para cada amostra, misturar (para um volume total de 32 µL por reação):
 - o Água sem nucleases 25 µL
 - o Tampão A da Salsa Ligase 3 µL
 - o Tampão B da Salsa Ligase 3 µL
 - Vortex, centrifugar brevemente
 - o Salsa Ligase 65 1 µL
 - Agitar em vórtice e centrifugar brevemente.
 - Após 60 minutos de incubação, passar ao **passo 3 do programa pré-PCR (ligação)**.
 - Baixar a temperatura do bloco aquecido para 54°C.
 - Adicionar 32 µL da mistura de ligação diretamente a cada tubo, sem os retirar do bloco aquecido.
 - Depois de distribuir a mistura, passar à etapa seguinte do programa (15 minutos a 54°C, 5 minutos a 98°C).
-  **No final desta etapa, quando a temperatura do bloco de PCR baixar para 4°C, passar imediatamente ao passo 4 (amplificação por PCR) ou congelar os produtos de ligação (entre -25°C e -15°C).**



Após este passo, não manter os produtos a temperaturas mais elevadas (por exemplo, 4°C ou temperatura ambiente) para evitar ligações não específicas que possam resultar da atividade enzimática residual.

Passo 4: Amplificação e incorporação de códigos de barras e adaptadores.

Nesta fase, os produtos de ligação são amplificados por PCR graças às caudas adicionais na extremidade das sondas. Estas amplificações são efectuadas utilizando pares de primers fornecidos nos tubos de código de barras **GENEXPATH LymphoSign** (GEP-BC-xxx).

Para permitir a análise de várias amostras na mesma célula de fluxo, o primer 3' da PCR tem um código de barras molecular que será reconhecido pelo algoritmo de demultiplexação da plataforma **GENEXPATH RT-MIS**.

Reagentes necessários.

Códigos de barras **GENEXPATH LymphoSign** (GEP-BC-xxx), Q5[®] Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, água sem nucleases.

Amplificação.

- Preparar uma mistura de amplificação na zona pré-PCR. Para cada amostra, misturar (para um volume total de 18 µL por reacção):
 - o Mistura principal Q5[®] de alta fidelidade 2X 12,5 µL
 - o Água sem nucleases 5,5 µL
- Agitar em vórtice e centrifugar brevemente.
- Distribuir 18 µL desta mistura de amplificação nos diferentes poços de uma placa PCR.
- Adicionar 5 µL de produtos de ligação gerados na etapa 3 a cada um dos poços.
- Adicionar 2 µL de código de barras **GENEXPATH LymphoSign** a cada poço.



Utilizar códigos de barras BEP-BC-xxx diferentes para cada amostra testada.

- Colocar a placa no termociclador na **zona pós-PCR**.
- Iniciar o **programa 2** (PCR).



No final do programa, quando a temperatura do termociclador baixar para 4°C, passar rapidamente ao passo 5 (purificação) ou congelar os produtos de amplificação entre -25°C e -15°C.



Não manter estes produtos a temperaturas mais elevadas durante um longo período de tempo (por exemplo, 4°C no termociclador ou à temperatura ambiente).

Passo 5: Purificação e ensaio das bibliotecas de sequenciação.

No final do passo de amplificação, as bibliotecas de sequenciação devem ser purificadas para eliminar os primers de PCR e os nucleótidos não incorporados. Esta purificação utiliza esferas magnéticas AMPure XP. As bibliotecas devem ser testadas por fluorimetria antes de serem carregadas no sequenciador.

Reagentes necessários.

Etanol a 100%, água sem nuclease, pérolas AMPure XP, tampão TE (10 mM Tris-Acetato pH 8,0, 1 mM EDTA), Qubit® dsDNA HS Assay.

Passo 5.a: Purificação das bibliotecas de sequenciação.



Assegurar que os esferas são completamente ressuspensas antes da utilização.

- Purificar 25 µL de produtos PCR com 45 µL de esferas AMPure XP (segundo as recomendações do fabricante).
- Eluir os produtos da PCR purificados em 50 µL de tampão TE.



Após a purificação, as bibliotecas podem ser armazenadas entre -25°C e -15°C antes da sequenciação.

Passo 5.b: Ensaio de bibliotecas de sequenciação:

- Analisar 10 µL de cada biblioteca de sequências por fluorimetria (kit Qubit dsDNA HS Assay, de acordo com as recomendações do fornecedor)

Passo 6: Diluição, agrupamento e sequenciação das bibliotecas.

Após a purificação, as bibliotecas **GENEXPATH LympoSign** devem ser diluídas, agrupadas e carregadas no sequenciador.



Para obter resultados óptimos, deve ser lido um mínimo de 10⁵ sequências para cada amostra.

Ao contrário da maioria das bibliotecas de sequenciação clássicas, a leitura dos códigos de barras moleculares necessários para a desmultiplexação das sequências **GENEXPATH LympoSign** ocorre durante a leitura¹. Por conseguinte, estas sequências não são desmultiplexadas automaticamente pelo sequenciador e serão guardadas em ficheiros fastQ "Undetermined" (indeterminados). A desmultiplexagem é efectuada utilizando o algoritmo específico fornecido na plataforma **GENEXPATH RT-MIS**.



Reagentes necessários.

Primer de sequenciação **GENEXPATH LymphoSign** (GEP-SP-001), reagentes de sequenciação Illumina.

Sequenciação num sequenciador Illumina MiSeq.

Para obter informações pormenorizadas sobre a diluição e a desnaturação das bibliotecas, a preparação do iniciador de sequenciação, a folha de injeção e o início da sequenciação, consulte o guia da Illumina para o sistema MiSeq.

- ***Passo 6.a: Diluição e agrupamento das bibliotecas.***

- Diluir cada biblioteca **GENEXPATH LymphoSign** numa concentração entre 2 nM e 4 nM, considerando um tamanho médio de fragmento amplificado de 150 pb.
- Juntar as bibliotecas **GENEXPATH LymphoSign** no volume equivalente.
- Se outras bibliotecas forem sequenciadas na mesma FlowCell, ajustar as concentrações dos diferentes pools e, em seguida, combiná-los para obter os números de sequência desejados (mínimo de 10^5 sequências para cada biblioteca **GENEXPATH LymphoSign**).

Exemplo: Para um pool de 10 bibliotecas **GENEXPATH LymphoSign** que requerem 1 M de sequências (10^5 sequências para cada biblioteca), sequenciadas com um pool de bibliotecas B com a mesma concentração e que requerem 3 M de sequências, juntar 1 μ L do pool de bibliotecas **GENEXPATH LymphoSign** e 3 μ L do pool de bibliotecas B.

- ***Passo 6.b: Desnaturação e diluição do pool de bibliotecas.***

- Desnaturar e diluir o pool final com base nas recomendações do guia Illumina para o sistema MiSeq, para obter uma concentração de carregamento final de 8 a 10 pM.

- ***Passo 6.c: Preparação do primer de sequenciação.***

- Se o pool de bibliotecas **GENEXPATH LymphoSign** for sequenciado sozinho, adicione 3 μ L do primer de sequenciação **GENEXPATH LymphoSign** (GEP-SP-001) a 597 μ L de tampão HT1 e, em seguida, coloque estes 600 μ L no poço 18 do cartucho de reagentes MiSeq.
- Se o pool de bibliotecas **GENEXPATH LymphoSign** estiver carregado com outras bibliotecas sequenciadas com primers de sequenciação Illumina, pipete todo o conteúdo do poço 12 (cerca de 600 μ L), adicione 3 μ L do primer de sequenciação **GENEXPATH LymphoSign** e coloque esta mistura no poço 18 do cartucho.

- **Passo 6.d: Preparação da folha de injeção.**

- Se a biblioteca **GENEXPATH LymphoSign** for sequenciada sozinha, crie a folha de injeção para gerar ficheiros FASTQ com 120 ciclos na leitura 1.
- Se as bibliotecas **GENEXPATH LymphoSign** forem combinadas com outras bibliotecas de sequenciação, gerar a folha de injeção utilizando os parâmetros habituais, sem introduzir as amostras **GENEXPATH LymphoSign**.
- Especificar a utilização de personalizado/custom durante a configuração da corrida (com o Local Run Manager na página Criar Corrida / Create Run. No modo de execução manual, no ecrã Configuração de corrida / Run Setup).



Em todos os casos, assegurar que a leitura 1 é efectuada com um mínimo de 120 ciclos e que é especificada a utilização de um primer de sequenciação personalizado.

- Em todos os casos, as sequências da biblioteca **GENEXPATH LymphoSign** não serão desmultiplexadas pelo sequenciador, mas serão guardadas num ficheiro FastQ "Undetermined", que será depois carregado na plataforma **GENEXPATH RT-MIS**.

- **Passo 6.e: Início da sequenciação.**

- Inicie a sequenciação seguindo o procedimento descrito no guia Illumina para o sistema MiSeq.

Sequenciação numa plataforma Illumina NextSeq 500/550.

Para obter informações pormenorizadas sobre a diluição e a desnaturação das bibliotecas, a preparação do primer de sequenciação, a folha de injeção e o início da sequenciação, consulte o guia Illumina para o sistema NextSeq.

- **Passo 6.a: Diluição e agrupamento das bibliotecas.**

- Diluir cada biblioteca **GENEXPATH LymphoSign** numa concentração entre 0,5 nM e 4 nM, considerando um tamanho médio de fragmento amplificado de 150 pb.
- Juntar as bibliotecas **GENEXPATH LymphoSign** no volume equivalente.
- Se forem sequenciadas outras bibliotecas na mesma FlowCell, ajustar as concentrações dos diferentes pools e depois combiná-los para obter os números de sequência desejados (mínimo de 10^5 sequências para cada biblioteca **GENEXPATH LymphoSign**).

Exemplo: Para um pool de 10 bibliotecas **GENEXPATH LymphoSign** que requerem 1 M de sequências (10^5 sequências para cada biblioteca), sequenciadas com um pool de bibliotecas B

com a mesma concentração e que requerem 3 M de sequências, juntar 1 µL do pool de bibliotecas **GENEXPATH LymphoSign** e 3 µL do pool de bibliotecas B.

- **Passo 6.b: Desnaturação e diluição do pool de bibliotecas.**

- Desnaturar e diluir o pool final com base nas recomendações do guia Illumina para o sistema NextSeq, para obter uma concentração de carregamento final de 0,8 pM a 1 pM.

- **Passo 6.c: Preparação do primer de sequenciação.**

- Se o pool de bibliotecas **GENEXPATH LymphoSign** for sequenciado sozinho, dilua 6 µL do primer de sequenciação **GENEXPATH LymphoSign** em 1994 µL de tampão HT1 e, em seguida, coloque estes 2 mL no poço 7 do cartucho de reagentes NextSeq.
- Se o pool de bibliotecas **GENEXPATH LymphoSign** for combinado com outras bibliotecas sequenciadas com primers de sequenciação Illumina, pipete todo o conteúdo do poço 20 (cerca de 2 ml), adicione 6 µL do primer de sequenciação GEP-SP e coloque esta mistura no poço 7 do cartucho.

- **Passo 6.d: Preparação da folha de injeção.**

- Se a biblioteca **GENEXPATH LymphoSign** for sequenciada sozinha, crie a folha de injeção para gerar ficheiros FASTQ com 120 ciclos na leitura 1.
- Se as bibliotecas **GENEXPATH LymphoSign** forem combinadas com outras bibliotecas de sequenciação, gerar a folha de injeção utilizando os parâmetros habituais, sem introduzir as amostras **GENEXPATH LymphoSign**.
- Especificar a utilização de personalizado durante a configuração da corrida / Run Setup (com o Local Run Manager na página Criar Corrida / Create Run . No modo de execução manual, no ecrã Configuração de corrida / Run Setup).



Em todos os casos, assegurar que a leitura 1 é efectuada com um mínimo de 120 ciclos e que é especificada a utilização de um iniciador de sequenciação personalizado.

- Em todos os casos, as sequências da biblioteca **GENEXPATH LymphoSign** não serão desmultiplexadas pelo sequenciador, mas serão guardadas nos quatro ficheiros FastQ "Undetermined", que serão depois carregados na plataforma **GENEXPATH RT-MIS**.

- **Passo 6.e: Início da sequenciação.**

- Inicie a sequenciação seguindo o procedimento descrito no guia Illumina para o sistema NextSeq.

Passo 7: Análise dos resultados.

Os ficheiros de sequências gerados pela plataforma de sequenciação Illumina (MiSeq ou NextSeq) no formato FastQ devem ser analisados utilizando o software **GENEXPATH RT-MIS** disponível através do espaço do cliente no seguinte endereço: <https://connect.genexpath.com/>.



Para ajudar a descarregar o ficheiro FastQ, este não deve ser descomprimido (fastq.gz).

Este software é uma solução bioinformática completa que inclui diferentes algoritmos de processamento de dados. Efectua a desmultiplexagem para atribuir sequências a cada amostra. Em seguida, identifica com precisão os marcadores de expressão genética e quantifica-os.

O teste **GENEXPATH LymphoSign** baseia-se tanto na quantificação de marcadores quantitativos (expressão genética) como em marcadores qualitativos (presença ou ausência de mutações e translocações cromossómicas).

O **GENEXPATH RT-MIS** inclui um algoritmo de inteligência artificial para ajudar o utilizador a utilizar os seus resultados. Gera relatórios concisos e transparentes que vão desde a implementação de reacções de sequenciação até à análise automática dos resultados da sequenciação.

O **GENEXPATH RT-MIS** requer que os ficheiros de sequenciação sejam carregados no formato FASTQ, bem como a lista de códigos de barras utilizados durante o teste.

O **GENEXPATH RT-MIS** avalia a qualidade da sequenciação de cada amostra através da quantificação do número de leituras identificadas e do número de UMI (identificadores moleculares únicos) detectados.

Para cada amostra, o **GENEXPATH RT-MIS** gera um gráfico para ajudar o utilizador a analisar os dados. Os dados de identificação de cada marcador e de cada amostra estão disponíveis para download.

O **GENEXPATH RT-MIS** inclui um guia do utilizador diretamente acessível em linha para explicar como utilizar a ferramenta, descrever todos os resultados gerados e explicar a apresentação dos resultados.

A empresa **GENEXPATH** não armazena permanentemente os resultados gerados pelo software **GENEXPATH RT-MIS**. Os dados devem ser descarregados diretamente após cada análise e guardados pelo utilizador no seu sistema de gestão de documentos.

Limites do procedimento

- O teste LymphoSign permite a avaliação simultânea dos níveis de expressão de um grande número de marcadores genéticos, tais como genes, mutações somáticas ou translocações cromossômicas, utilizando sondas específicas. Destina-se ao diagnóstico do linfoma não-Hodgkin. As amostras testadas devem ser biópsias de tecido FFPE ou congeladas.
- O desempenho demonstrado no parágrafo "Desempenho analítico" foi validado de acordo com as instruções acima indicadas.
- Uma quantidade reduzida de ARN ou uma amostra de baixa qualidade pode causar um resultado não interpretável.
- A sequenciação deve ser efectuada com sequenciadores de tecnologia Illumina (Miseq e NextSeq).

Desempenho analítico

Repetibilidade

A repetibilidade do teste LymphoSign é definida como a sua capacidade de quantificar com exatidão cada um dos marcadores do teste. Foi estudada a mesma amostra analisada em triplicado pela assinatura LymphoSign. Para cada marcador, as dispersões entre os valores medidos e os valores médios esperados são apresentadas no gráfico de Bland Altman na Figura 1. A baixa dispersão das medições demonstra a elevada repetibilidade da assinatura LymphoSign para a mesma amostra.

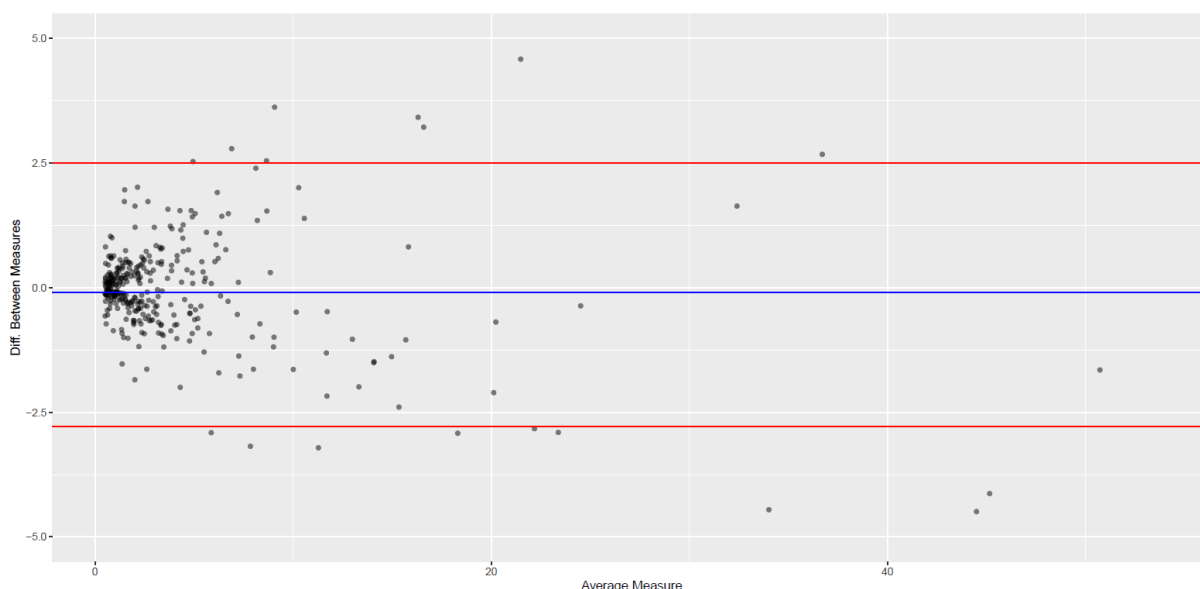


Figura 1: Diferença entre as medições observadas e esperadas de cada marcador de teste para a mesma amostra. A linha azul representa o desvio médio observado entre os valores médios

de cada marcador e os valores medidos. As linhas vermelhas representam os intervalos de confiança a 95%

Interoperabilidade

O teste Lymphosign é compatível com a tecnologia de sequenciação Illumina. A fim de avaliar o impacto da natureza do sequenciador nos resultados, foram analisadas 15 amostras nos sequenciadores MiSeq e NextSeq. Os dados gerados são perfeitamente comparáveis com um coeficiente de correlação de Pearson $r=0,99$ ($p < 2,2e^{-16}$) (Figura 2).

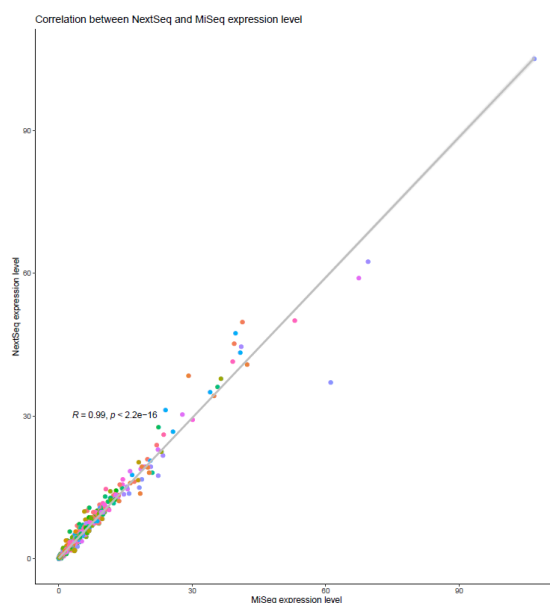


Figura 2: Correlação entre os níveis de expressão de marcadores de 15 amostras sequenciadas no MiSeq e no NextSeq. O coeficiente e o valor de p relatados são os de um teste de correlação linear de Pearson.

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade entre dois utilizadores foi estudada em função dos níveis de expressão de cada um dos marcadores de teste em 2 amostras (Figura 3). Os dados são perfeitamente comparáveis com uma reprodutibilidade perfeita da medição da expressão de cada um dos marcadores (Pearson: $r \approx 1$, $p < 2,2e^{-16}$).

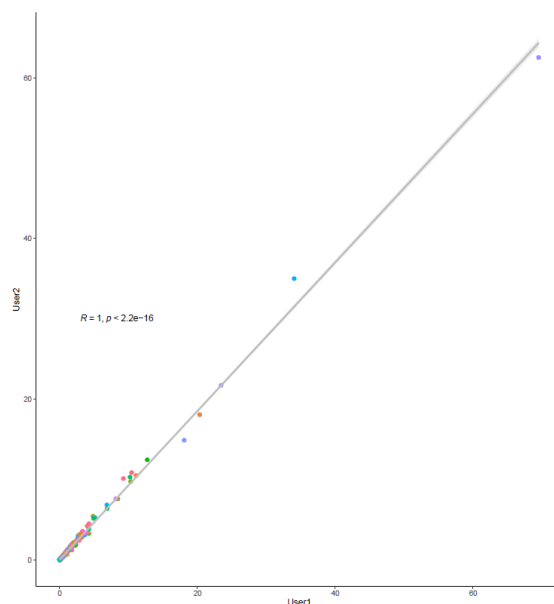











Figura 3: Correlação entre os níveis de expressão dos marcadores entre dois utilizadores. O coeficiente e o valor de p indicados são os de um teste de correlação linear de Person.

Bibliografia

[Combining gene expression profiling and machine learning to diagnose B-cell non-Hodgkin lymphoma.](#) Bobée V, Drieux F, Marchand V, Sater V, Veresezan L, Picquetot JM, Viailly PJ, Lanic MD, Viennot M, Bohers E, Oberic L, Copie-Bergman C, Molina TJ, Gaulard P, Haioun C, Salles G, Tilly H, Jardin F, Ruminy P. Blood Cancer J. 2020 22 de maio; 10 (5): 59.

Tabela de símbolos

 fabricante	 nome do reagente
 data de fabrico	 limite de temperatura
 prazo de validade	 ver de instruções
 código do lote	 Marcação CE conformidade europeia
	 dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>



Notas

Os reagentes **GENEXPATH LymphoSign** estão protegidos por direitos de propriedade intelectual e não podem ser modificados, reproduzidos, vendidos ou transferidos sem a autorização do fabricante.

As informações contidas neste documento são susceptíveis de sofrer alterações.