

ISTRUZIONI PER L'USO

16, 32, 48 E 96 CAMPIONI

SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution



Per uso diagnostico in vitro (IVD)
Non per l'autotest





SINTESI DELLE INFORMAZIONI

Nome prodotto	SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution
Tipo di prodotto	Soluzione bundle
Famiglia di prodotti	Applicazione di diagnostica molecolare (kit + analisi)
ID algoritmo	ILL1XG1G6_CNV
ID pannello geni	HCS v1.1
Versione del prodotto	1,1
Tipo di campione	DNA germinale isolato da sangue periferico
Sequenziatore	Illumina - MiSeq
Descrizione GMDN	Kit di reagenti per IVD / Software interpretativo di analisi genomica umana
ID documento	SG-00676
Versione del documento	v9.0
Data di revisione	Gennaio 2026

Queste istruzioni per l'uso (IFU) sono applicabili a tutte le versioni di SOPHiA DDM™ Dx.
Si prega di leggere attentamente le IFU prima di utilizzare questo prodotto.



SOPHiA GENETICS SA
ZA La Pièce 12
1180 Rolle
Switzerland



BS0102ILLCGLL01-016
BS0102ILLCGLL01-032
BS0102ILLCGLL01-048
BS0102ILLCGLL01-096



SOPHiA GENETICS SAS
Technopole Izarbel
158 allée Fauste d'Elhuyar
F-64210 Bidart, France





CODICI DEI PRODOTTI

	CODICE PRODOTTO COMPLETO	BOX 1	BOX 2	KIT PREPARAZIONE LIBRERIA
REF	BS0102ILLCGLL01-016	B1.01.0002.C-16	B2.0001.C-16	700232
	BS0102ILLCGLL01-032	B1.01.0002.C-32	B2.0001.C-32	700232
	BS0102ILLCGLL01-048	B1.01.0002.C-48	B2.0001.C-48	700234
	BS0102ILLCGLL01-096	B1.01.0002.C-96	B2.0001.C-48	700234



ESONERO DA RESPONSABILITÀ

Questo documento e il suo contenuto sono di proprietà di SOPHiA GENETICS SA e delle sue affiliate ("SOPHiA GENETICS") e sono destinati esclusivamente all'uso contrattuale da parte del cliente in relazione all'uso del prodotto o dei prodotti qui descritti e per nessun'altra finalità. Questo documento e i suoi contenuti non devono essere utilizzati né distribuiti per qualsiasi altra finalità e/o altrimenti comunicati, divulgati o riprodotti, o citati come riferimento in qualsiasi modo senza il previo consenso scritto di SOPHiA GENETICS.

SOPHiA GENETICS non trasferisce alcuna licenza con i suoi diritti di brevetto, marchio commerciale, copyright o common law né diritti simili di terze parti con il presente documento. Le istruzioni contenute in questo documento devono essere rigorosamente ed esplicitamente seguite da personale qualificato e adeguatamente addestrato per garantire l'uso corretto e sicuro del prodotto o dei prodotti qui descritti. Prima di utilizzare questi prodotti, tutto il contenuto del presente documento deve essere completamente letto e compreso.

LA MANCATA LETTURA COMPLETA E L'ESPLICITA OSSERVANZA DI TUTTE LE ISTRUZIONI CONTENUTE NEL PRESENTE DOCUMENTO POSSONO PROVOCARE DANNI AI PRODOTTI, LESIONI A PERSONE, COMPRESI GLI UTENTI O TERZI, E DANNI AD ALTRE PROPRIETÀ.

SOPHiA GENETICS NON SI ASSUME ALCUNA RESPONSABILITÀ DERIVANTE DALL'USO SCORRETTO DEI PRODOTTI DESCRITTI NEL PRESENTE DOCUMENTO (COMPRESI PARTI DI ESSO O IL RELATIVO SOFTWARE).

MARCHI COMMERCIALI

Illumina® e MiSeq® sono marchi registrati di Illumina, Inc.

AMPure® e Agencourt® sono marchi registrati di Beckman Coulter, Inc.

Qubit® e Dynabeads® sono marchi registrati di Thermo Fisher Scientific Inc.

KAPA™ è un marchio commerciale di Roche.

QIAseq® è un marchio registrato di Qiagen.

SOPHiA GENETICS™ e SOPHiA DDM™ Dx sono marchi di SOPHiA GENETICS SA e/o delle sue affiliate negli Stati Uniti e/o in altri paesi. Tutti gli altri nomi, logo e altri marchi commerciali sono di proprietà dei rispettivi titolari. SALVO OVE APPOSITAMENTE SPECIFICATO, L'USO DA PARTE DI SOPHiA GENETICS DI MARCHI COMMERCIALI DI TERZE PARTI NON INDICA ALCUN RAPPORTO, SPONSORIZZAZIONE O APPROVAZIONE TRA SOPHiA GENETICS E I TITOLARI DI QUESTI MARCHI COMMERCIALI. Qualsiasi riferimento da parte di SOPHiA GENETICS a marchi di terze parti ha lo scopo di identificare i corrispondenti beni e/o servizi di terze parti e viene considerato "uso corretto di nominativi" secondo quanto disposto dalla legge sui marchi commerciali.



CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

ID DOCUMENTO/VERSIONE	DATA	Versione equivalente delle istruzioni per l'uso in inglese	DESCRIZIONE DELLA MODIFICA
SG-00676 – 9.0	Gennaio 2026	SG-00658 – 11	- Modifica al sistema di numerazione delle versioni, nessuna versione aggiuntiva tra la versione 8.1 e la versione 9.0 - Aggiunta una nuova colonna nella tabella della cronologia delle revisioni per tenere traccia della versione inglese corrispondente; la colonna è vuota per tutte le revisioni precedenti - Sezione 2: La Dichiarazione generale dei principi e della procedura di prova include la Sintesi e spiegazione del test. - Sezione 4: Rimozione della descrizione dei componenti non IVD dall'ambito di applicazione del dispositivo. - Avvertenze e Precauzioni: Aggiunta dell'identificazione CAS e della concentrazione per ciascun componente pericoloso elencato. - Sezione 6: Rimozione delle istruzioni di analisi dell'applicazione desktop SOPHiA DDM. - Sezione 7: Rimozione delle limitazioni che esulano dall'ambito trattato. - Sezione 7: Aggiunta di una limitazione relativa all'index hopping. "App Web SOPHiA DDM™" è cambiato in "Modalità SOPHiA DDM™ Dx" - Riformulazioni minori relative alla modifica di cui sopra - Riduzione del volume del contenuto delle sonde di ibridazione SOPHiA GENETICS da 20 µl a 18 µl (vedere la sezione 5.1.1 Contenuto del kit - BOX 1) - Rimossa la proprietà intellettuale del fornitore di terze parti dalle sezioni 5.1.1 Contenuto del kit, 5.3.1 Pooling di librerie e 5.3.2 Ibridazione - Aggiornamento del nome del componente del kit di preparazione della libreria in SOPHiA GENETICS Library Prep Kit I. - Aggiunta una nuova colonna nella tabella della cronologia delle revisioni per tenere traccia della versione inglese corrispondente; la colonna è vuota per tutte le revisioni precedenti.
SG-00676 - 8.1	9 gen. 23		Correzione degli errori di formattazione
SG-00676 - 8.0	5 dic 22		Correzione di vari errori di trascrizione
SG-00676 - 7.0	2 dic 22		- Sezione 5.1.2 e Sezione 5.3.6 - Correzione per aggiungere materiale autofornito. - Correzione di vari errori di trascrizione
SG-00676 - 6.0	14 set 22		- Aggiunta del simbolo del marchio commerciale SOPHiA DDM e SOPHiA GENETICS - Nome del kit preparazione libreria modificato in SOPHiA GENETICS in tutto il documento.



ID DOCUMENTO/VERSIONE	DATA	Versione equivalente delle istruzioni per l'uso in inglese	DESCRIZIONE DELLA MODIFICA
			Versione del documento aggiornata al numero intero successivo senza decimali
SG-00676 - 5.5	19 apr. 22		Sono state aggiunte istruzioni per l'applicazione web SOPHiA DDM™
SG-00676 - 5.4	14 apr. 22		- Limitazioni e avvertenze: Modificato - Versioni del prodotto rettificate - Indirizzo dell'ufficio di SOPHiA GENETICS aggiornato - Modifiche Wet Lab come raccomandato globalmente - Modifiche all'ID del documento
ID-60101-15 - 5.3	21 lug. 21		- Pagina 2, 30 - Modifiche estetiche. - Pagina 18 - Ordine dei passaggi modificato. - Pagina 27 - volume pre-mix PCR "da 48 campioni" corretto.
ID-60101-15 - 5.2	16 giu. 21		- Pagina 3 - Marchio commerciale modificato. - Pagina 45 - Piccola aggiunta nelle specifiche del file. - Pagine 55, 56 - Refuso "Unico" nell'intestazione rimosso.
ID-60101-15 - 5.1	28 mag. 21		- Pagina 2 - Tabella delle informazioni riepilogative modificata. - Pagina 3 - Esonero da responsabilità modificato. - Pagine 12, 14, 16, 30 - Intestazione della tabella modificata. - Pagina 17 - Passaggi 1 e 2 della sequenza scambiati. - Pagina 18 - Preparazione dell'etanolo spostata in "Preparazione". - Pagine 13, 19, 20, 22, 23, 24, 28, 36, 37, 38, 39, 44 - Modifiche estetiche e refusi. - Pagina 21 - Punto 1, punto elenco 2 - cambiato "Potenziatore FX" in "Pre-mix reazione FX Reaction". - Pagina 47 - Punto elenco 2 aggiunto.
ID-60101-15 - 5.0	30 mar. 21		- Pagina del titolo, logo aziendale, intestazione, piè di pagina, ultima pagina. - Argomenti riorganizzati. - Inclusi installazione, caricamento e istruzioni sulla convenzione di denominazione dell'app web SOPHiA DDM™. - Combinare insieme le "Istruzioni per l'uso" di quattro formati di kit per includere numeri di campioni diversi. Includere le tabelle e apportare le opportune modifiche, se e quando necessario. - Sono stati combinati i documenti "Istruzioni per l'uso" dei seguenti kit: - PM_CEIVD_B.2.1.1.19_r3en - M_CEIVD_B.2.1.1.17_r3en - PM_CEIVD_B.2.1.1.15_r3en - PM_CEIVD_B.2.1.1.26_r2en - Piccole modifiche per chiarezza nelle sezioni seguenti: - Sezione 5.3.1 Pooling della libreria - Sezione 5.3.5 Lavare le sfere di streptavidina per rimuovere il DNA non legato



SOMMARIO

1. Uso/finalità previsti.....	9
2. Dichiarazione generale dei principi di prova / procedurali	10
3. Componenti del prodotto	11
4. Materiali e metodi del kit.....	12
4.1. Considerazioni iniziali	12
4.1.1. Contenuto del kit (16, 32, 48 o 96 campioni).....	12
4.1.2. Materiale richiesto (non fornito)	17
4.2. Preparazione libreria	18
4.2.1. Preparazione del DNA genomico	18
4.2.2. Preparazione dei pre-mix e dei reagenti	19
4.2.3. Frammentazione enzimatica, riparazione finale e A-tailing.....	21
4.2.4. Legatura	22
4.2.5. Pulizia post-legatura.....	24
4.2.6. Selezione dimensione doppia	25
4.2.7. Amplificazione della libreria	26
4.2.8. Pulizia post-amplificazione	27
4.2.9. Quantificazione individuale della libreria e controllo qualità	28
4.3. Cattura	29
4.3.1. Pooling della libreria.....	29
4.3.2. Ibridazione.....	30
4.3.3. Preparazione delle sfere di streptavidina	33
4.3.4. Legame di target ibridati alle sfere	34
4.3.5. Lavare le sfere di streptavidina per rimuovere il DNA non legato	35
4.3.6. Amplificazione post-cattura	36
4.3.7. Pulizia post-cattura dell'amplificazione.....	38
4.3.8. Quantificazione finale della libreria e controllo qualità	39
4.4. Sequenziamento	40
4.4.1. Preparazione della libreria per il sequenziamento	40
5. Procedura di analisi	41
5.1. Modalità SOPHiA DDM™ Dx Istruzioni per l'installazione.....	41
5.2. Descrizione del flusso di lavoro di analisi per la generazione di risultati IVD	41
6. Limitazioni, avvertenze e precauzioni	42
7. Valutazione della performance non cliniche	45
7.1. CARATTERISTICHE DELLA PERFORMANCE ANALITICA	45
7.2. METODI	45
7.3. DATI (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)	47
7.4. CONCLUSIONI GENERALI (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)	47
7.5. RISULTATI (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0).....	49
7.6. STUDIO PONTE (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1)	49
7.7. CONCLUSIONE	50



8. Simboli 51

9. Supporto 52

Appendice 1. Piastre adattatrici a doppio indice 53

Appendice 2. Attrezzatura di laboratorio usata nel laboratorio di SOPHiA GENETICS 56

Appendice 3. Flusso di lavoro generale – SOPHiA DDM™ Capture Solutions 58

Appendice 4. Elenco delle regioni target, regioni problematiche applicabili e contrassegnate 60



1. USO/FINALITÀ PREVISTI

SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS) è un test diagnostico in vitro destinato all'identificazione delle variazioni germinali che si verificano nei 27 geni più comuni coinvolti nella predisposizione ai tumori al seno e alle ovaie, nonché ai tumori intestinali in campioni di DNA germinale isolati dal sangue periferico (Tabella 1). SOPHiA DDM™ Dx HCS è un test di sequenziamento di nuova generazione (NGS) sullo strumento Illumina MiSeq® ed è indicato per essere utilizzato come ausilio per i professionisti sanitari e per fornire un razionale molecolare ai fini di una decisione clinica relativa alle mutazioni germinali associate alle malattie elencate nella Tabella 1.



2. DICHIARAZIONE GENERALE DEI PRINCIPI DI PROVA / PROCEDURALI

La funzione convalidata dell'analisi SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS) consiste nell'analizzare i dati NGS grezzi generati da uno strumento Illumina® MiSeq® con MiSeq® Reagent Kit v3, su campioni germinali con SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I.

SOPHiA DDM™ Dx HCS si basa su tre passaggi principali. Il primo passaggio è la qualificazione del campione di DNA che può essere utilizzato per il test. La seconda consiste nel preparare manualmente i campioni per il sequenziamento, un'operazione nota come preparazione della libreria. La preparazione della libreria consiste in sette fasi chiave: Frammentazione del DNA, legatura degli adattatori, amplificazione PCR delle singole librerie, pooling delle librerie, ibridazione delle sonde, cattura e amplificazione PCR post-cattura. La terza fase è il sequenziamento del campione preparato usando la chimica SBS (sequenziamento per sintesi) sul sequenziatore Illumina® MiSeq®.

Per l'analisi, i risultati devono essere caricati nella modalità SOPHiA DDM™ Dx e analizzati utilizzando l'applicazione SOPHiA DDM™ Dx HCS.

Si noti che i risultati di un'analisi genetica dovrebbero essere interpretati solo da esperti qualificati in genetica molecolare: (come uno European registered Clinical Laboratory Geneticist (ErCLG) certificato dallo European Board of Medical Genetics (EBMG)).

La seguente tabella mostra i geni che vengono bersagliati da SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS), spesso reperibili in varie sindromi cancerose ereditarie.

Tabella 1: Geni bersagliati da SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS)

ABRAXAS1	EPCAM	PMS2
APC	MLH1	PMS2CL
ATM	MRE11A	PTEN
BARD1	MSH2	RAD50
BRCA1	MSH6	RAD51C
BRCA2	MUTYH	RAD51D
BRIP1	NBN	STK11
CDH1	PALB2	TP53
CHEK2	PIK3CA	XRCC2



3. COMPONENTI DEL PRODOTTO

SOPHiA DDM™ Dx HCS è costituito da due componenti: il kit NGS e la pipeline bioinformatica utilizzata in combinazione con un accessorio IVD, la modalità SOPHiA DDM™ Dx basata su cloud.

- Lo scopo del kit NGS è preparare e arricchire le librerie di DNA da campioni di sangue adatti al sequenziamento su un sequenziatore Illumina MiSeq®. Il kit NGS consente di generare dati di sequenziamento mirati. Gli elementi sono descritti nella seguente sezione 5. Materiali e metodi del kit – 5.1. Considerazioni iniziali - 5.1.1 Contenuto del kit.
- La pipeline bioinformatica ("pipeline HCS") processa i dati grezzi NGS mediante algoritmi in grado di valutare l'integrità genomica.
- La modalità SOPHiA DDM™ Dx è un'applicazione front-end basata sul web, disponibile come "software-as-a-service" (SaaS), utilizzata per generare un rapporto scaricabile per i geni menzionati nella Tabella 1 per SNV e INDEL germinali. Si applicano limitazioni - si rimanda alla sezione 7 - Limitazioni, avvertenze e precauzioni.



4. MATERIALI E METODI DEL KIT

4.1. Considerazioni iniziali

Per una prestazione ottimale del kit, assicurarsi che tutte le provette siano fisicamente intatte e conservate alle temperature raccomandate, al momento della ricezione. La manipolazione scorretta e lo stoccaggio dei componenti del kit in condizioni diverse possono influenzare negativamente le prestazioni del kit.

4.1.1. Contenuto del kit (16, 32, 48 o 96 campioni)

Centrifugare sempre brevemente le provette prima dell'uso per raccogliere tutto il liquido.

A seconda del formato del kit, vengono forniti i seguenti componenti:

COMPONENTE	NUMERO DI ARTICOLI A SECONDA DEL FORMATO DEL KIT			
	da 16 campioni kit	da 32 campioni kit	da 48 campioni kit	da 96 campioni kit
BOX 1	1	1	1	2 (48 campioni ciascuno)
Adattatori a doppio indice compatibili con Illumina® (in formato piastra a 96 pozzetti inclusi nella Box 1)	32	32	48	96 (Piastra contenuta in una delle due Box 1)
BOX 2	1	1	1	2 (48 campioni ciascuno)
SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I	1	2 (16 campioni ciascuno)	1	2 (48 campioni ciascuno)



BOX 1 (CONSERVARE TRA -25 °C E -15 °C)

- Universal Blockers - TS Mix (12 µl)
- Human Cot DNA (25 µl)
- Hereditary Cancer Solution probes by SOPHiA GENETICS (18 µl)
- 2x Hybridization Buffer (75 µl)
- Hybridization Buffer Enhancer (30 µl)
- 2x Bead Wash Buffer (1250 µl)
- 10x Stringent Wash Buffer (200 µl)
- 10x Wash Buffer I (160 µl)
- 10x Wash Buffer II (110 µl)
- 10x Wash Buffer III (110 µl)
- A seconda del formato del kit: 32, 48 o 96 adattatori compatibili Illumina® a doppio indice in formato piastra da 96 pozzetti (7 µl ciascuno): vedere l'Appendice 1 per la visualizzazione e le sequenze degli adattatori.

BOX 2 (CONSERVARE TRA +2 °C E +8 °C)

- Dynabeads® M-270 Streptavidin (440 µl)
- Agencourt® AMPure® XP (3 x 1,5 ml per 16 campioni, 8,7 ml per 32 campioni e 11,6 ml per 48 campioni, vedere la nota per 96 campioni)
- IDTE Low TE Buffer (10 ml)
- Nuclease-free water (20 ml)

Nota: Per 96 campioni, vengono fornite due Box 2 da 48 campioni (vedere la tabella nella pagina precedente).



Importante: Fare riferimento alle avvertenze e alle precauzioni qui sotto per ulteriori dettagli.



SOPHiA GENETICS™ DNA LIBRARY PREP KIT I *

(CONSERVARE TRA -25°C E -15°C)

- Per 32 campioni vengono forniti due kit da 16 campioni.
- Per 96 campioni vengono forniti due kit da 48 campioni.

COMPONENTI	FORMATO DEL KIT	
	Kit da 16 campioni	Kit da 48 campioni
HiFi PCR Master Mix 2x (in µl)	500	1560
Primer Mix Illumina® Library Amp (Primer Mix Illumina® amplificatore librerie) (in µl)	30	95
FX Enzyme Mix (FX Mix enzimi) (in µl)	200	625
FX Buffer (FX tampone) 10x (in µl)	100	315
FX Enhancer (in µl)	100	315
DNA Ligase (DNA ligasi) (in µl)	200	625
DNA Ligase Buffer (tampone DNA ligasi) 5x (in µl)	400	1250

* SOPHiA GENETICS è il distributore esclusivo di questo kit per la preparazione della libreria.

Importante: Fare riferimento alle avvertenze e alle precauzioni qui sotto per ulteriori dettagli.



AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Nome del prodotto	GHS Pittogramma	Frase H e P	Parole di segnalazione	Componente pericoloso
2X Tampone di ibridazione	 	• H300 Letale se ingerito. • H311 Tossico per contatto con la pelle. • H315 Provoca irritazione cutanea. • H370 Provoca danni agli organi. • H370 Provoca danni agli organi (sistema nervoso centrale). • H411 Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. • P260 Non respirare i vapori/gli aerosol. • P264 Lavare accuratamente la pelle contaminata dopo l'uso. • P270 Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso. • P273 Non disperdere nell'ambiente. • P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/il viso. • P301+P310 In caso di ingestione: contattare immediatamente un centro antiveleni/un medico. • P302+P352 In caso di contatto con la pelle: lavare abbondantemente con acqua. • P308+P311 In caso di esposizione o di possibile esposizione: contattare un centro antiveleni o un medico. • P321 Trattamento specifico (vedere il consiglio medico su questa etichetta). • P330 Sciacquare la bocca. • P332+P313 In caso di irritazione della pelle: consultare un medico. • P362+P364 Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. • P391 Raccogliere il materiale fuoriuscito. • P405 Conservare sotto chiave. • P501 Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative nazionali.	Pericolo	Cloruro di ammonio tetrametilico Concentrazione: 49 % CAS: 75-57-0
Potenziatore per tamponi di ibridazione		• H351 Sospettato di provocare il cancro. • H360 Può nuocere alla fertilità o al feto. • H373 Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta. • P201 Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso. • P202 Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.	Pericolo	Formammide Concentrazione: 100% CAS: 75-12-7



Nome del prodotto	GHS Pittogramma	Fraasi H e P	Parole di segnalazione	Componente pericoloso
		- P260 Non respirare i vapori/gli aerosol. - P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/il viso. - P308+P313 In caso di esposizione o di possibile esposizione: consultare un medico. - P314 In caso di malessere, consultare un medico. - P405 Conservare sotto chiave. - P501 Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative nazionali.		
10x tampone di lavaggio stringente		- H302 Nocivo se ingerito. - H315 Provoca irritazione cutanea. - H319 Provoca grave irritazione oculare.	Pericolo	Sale sodico dell'acido etilendiammintretrace tico Concentrazione: 2,5 % CAS: 6381-92-6
10x tampone di lavaggio I		- H228 Solido infiammabile. - H302 Nocivo se ingerito. - H315 Provoca irritazione cutanea. - H318 Provoca gravi lesioni oculari. - H332 Nocivo se inalato. - H401 Tossico per gli organismi acquatici. - H402 Nocivo per gli organismi acquatici. - H412 Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. - P273 Non disperdere nell'ambiente. - P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/il viso. - P305+P351+P338 In caso di contatto con gli occhi: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. - P310 Contattare immediatamente un centro antiveleni/un medico. - P501 Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative nazionali.	Pericolo	Dodecilsolfato sodico Concentrazione: 4,9 % CAS: 151-21-3
DNA Ligase Buffer (tampone DNA ligasi) 5x		- H335 Può irritare le vie respiratorie. - P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/il viso/l'udito.	Avvertenza	poli(etilen-glicole)nota Concentrazione: 1-5% CAS: 9002-93-1

Usare  e  come dispositivo di protezione individuale.



4.1.2. Materiale richiesto (non fornito)

MATERIALI FORNITI DALL'UTENTE (DA ACQUISTARE SEPARATAMENTE)

- Kit amplificazione libreria KAPA™ KK2620 (Roche N. No: 07958978001)
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml
- Provette a basso legame con il DNA da 1,5 ml
- Provette da 1,5 ml
- Provette coniche da 50 ml
- Punte filtro
- Etanolo (grado biologia molecolare)
- Reagenti per il sequenziamento Illumina®.

ATTREZZATURA DA LABORATORIO

Per evitare la contaminazione del campione:

- Zona pre-PCR
 - Attrezzatura e reagenti per la quantificazione fluorometrica
 - Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti
 - Pipette multicanale (P10 o P20; P100; P200)
 - Microcentrifuga da banco (compatibile con strisce da 8 provette)
 - Termociclatore (coperchio riscaldato programmabile)
 - Miscelatore a vortice
- Zona post-PCR
 - Sistema di elettroforesi capillare
 - Concentratore di vuoto DNA
 - Termoblocco o a bagnomaria (compatibile con provette da 1,5 ml)
 - Attrezzatura e reagenti per la quantificazione fluorometrica
 - Rack a separazione magnetica (compatibile con provette da 1,5 ml)
 - Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti
 - Pipette multicanale (P10 o P20; P100; P200)
 - Microcentrifuga da banco (compatibile con strisce da 8 provette)
 - Termociclatore (coperchio riscaldato programmabile)
 - Miscelatore a vortice



4.2. Preparazione libreria

4.2.1. Preparazione del DNA genomico

MATERIALI

- DNA genomico a doppio filamento di alta qualità (gDNA)
- FX Enhancer
- IDTE
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

IMPORTANTE

L'integrità, la concentrazione e la purezza del DNA sono fondamentali in questo passaggio. La purezza del DNA può essere valutata con uno spettrofotometro UV. I rapporti di assorbanza raccomandati sono entro 1,8-2,0 per il rapporto 260/280, ed entro 1,6-2,4 per 260/230. Si raccomanda di verificare l'integrità del campione mediante elettroforesi capillare o una tecnica equivalente. Per evitare errori nell'input del DNA, si raccomanda una diluizione iniziale per ottenere una concentrazione compresa tra 50 e 100 ng/μl. La concentrazione del DNA dovrebbe essere confermata tramite quantificazione fluorometrica (ad es. Qubit®, Thermo Fisher) e il valore ottenuto dovrebbe essere usato per calcolare la diluizione finale.

PREPARAZIONE

Rimuovere la soluzione di condizionamento FX Enhancer dalla conservazione a -20 °C e scongelare a temperatura ambiente. Dopo lo scongelamento, mescolare il reagente invertendo delicatamente la provetta 5 volte e centrifugare brevemente in una microcentrifuga.

A seconda del formato del kit, il numero di campioni di DNA da raggruppare per ciascuna reazione di cattura varia secondo la seguente tabella. Questo aspetto deve essere preso in considerazione prima di iniziare.

FORMATO DEL KIT	Kit da 16 campioni	Kit da 32 campioni	Kit da 48 campioni	Kit da 96 campioni*
Numero di librerie individuali per cattura	4	8	12	12

* Per 96 campioni vengono forniti due kit da 48 campioni, che includono 8 reazioni di cattura.

PROCEDURA

1. Preparare le seguenti strisce PCR in base al numero di reazioni:

NUMERO DI REAZIONI	4	8	12	16	24	32	48
Striscia PCR	4 provette	4 provette	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Numero di strisce	1	2	3	2	3	4	6



2. Preparare una diluizione per ciascun campione di DNA genomico (gDNA) di alta qualità nel numero appropriato di strisce PCR come segue:

DILUIZIONE gDNA	
gDNA	200 ng
IDTE	Completare a 30 µl

- Mescolare brevemente pipettando delicatamente su e giù 5 volte e centrifugare brevemente in una microcentrifuga per raccogliere tutto il liquido.
-  **Suggerimento:** Punto di arresto sicuro durante la notte a 4 °C.
- A seconda del numero di campioni, procedere come segue:
 - Se si stanno processando **4 campioni**, aggiungere 5 µl di FX Enhancer a ciascuna provetta della striscia da 4 provette contenente 30 µl di campioni di gDNA (un totale di 35 µl in ciascuna provetta della striscia da 4 provette).
 - Se si stanno processando **8 o più campioni**, procedere come segue:
 - a. Per facilitare il pipettaggio, creare una riserva di FX Enhancer aggiungendo i seguenti volumi a un nuovo set di strisce da 4 o 8 provette secondo il seguente schema:

NUMERO DI REAZIONI	8	12	16	24	32	48
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette	8 provette
FX Enhancer (in µl)	11,5	17,5	11,5	17,5	24	36

- b. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 5 µl di FX Enhancer dalle provette di cui sopra ai 30 µl di campioni di gDNA (totale di 35 µl in ciascuna provetta delle strisce da 4 o 8 provette).
- Usando una pipetta multicanale impostata su 20 µl, mescolare delicatamente pipettando su e giù 5 volte e centrifugare brevemente in una microcentrifuga.

3. Tenere sul ghiaccio fino alla predisposizione della reazione di frammentazione enzimatica.

4.2.2. Preparazione dei pre-mix e dei reagenti

COMPONENTI E REAGENTI

- FX Enzyme Mix (FX Mix enzimi)
- FX Buffer (FX tampone) 10x
- DNA Ligase Buffer (tampone DNA ligasi) 5x
- DNA Ligase (DNA ligasi)
- HiFi PCR Master Mix 2x
- Primer Mix Illumina® Library Amp (Primer Mix Illumina® amplificatore librerie)
- Acqua senza nucleasi
- Sfere AMPure® XP
- Etanolo



PREPARAZIONE

- Rimuovere i componenti di SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I dalla conservazione a -20°C e scongelare sul ghiaccio.
- Rimuovere la piastra adattatrice a doppio indice dal luogo di conservazione a -20 °C e metterla in frigorifero a 4 °C per usarla successivamente.
- Rimuovere le sfere AMPure® XP dal luogo di conservazione a 2-8 °C e lasciarle acclimatare alla temperatura ambiente per almeno 30 minuti.
- Preparare l'etanolo fresco all'80% (volume secondo il seguente schema in base al numero di reazioni):

80% ETANOLO							
Numero di reazioni	4	8	12	16	24	32	48
80% Etanolo (in ml)	10	20	30	30	40	50	70

- Una volta scongelati i componenti del SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I, mescolare i reagenti capovolgendo la provetta 5-10 volte e centrifugare brevemente in una microcentrifuga.

PRE-MIX

1. Preparare il **pre-mix di reazione FX** come segue:

PRE-MIX DI REAZIONE FX							
Numero di reazioni	4	8	12	16	24	32	48
FX Buffer (FX tampone) 10x (in µl)	23,6	47,1	75	95	150	190	300
FX Enzyme Mix (FX Mix enzimi) (in µl)	47,1	94,2	150	190	300	380	600

- Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
- Tenere sul ghiaccio.

2. Preparare il **pre-mix di legatura** come segue:

PRE-MIX DI LEGATURA							
Numero di reazioni	4	8	12	16	24	32	48
DNA Ligation Buffer 5x (in µl)	95	190	300	380	600	760	1200
DNA Ligase (DNA ligasi) (in µl)	47,5	95	150	190	300	380	600
Acqua senza nucleasi (in µl)	71,3	142,5	225	285	450	570	900

- Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
- Tenere sul ghiaccio.



Importante: il tampone di legatura del DNA è altamente viscoso; pipettare delicatamente e assicurarsi di ottenere un pre-mix di legatura omogeneo.

3. Preparare il **pre-mix PCR** come segue:

PRE-MIX PCR							
Numero di reazioni	4	8	12	16	24	32	48
HiFi PCR Master Mix 2x (in µl)	115	230	345	460	690	920	1380
Primer Mix Illumina® Library Amp (Primer Mix Illumina® amplificatore librerie) (in µl)	6,9	13,8	20,7	27,6	41,4	55,2	82,8
Acqua senza nucleasi (in µl)	16,1	32,2	48,3	64,4	96,6	128,2	193,2

- Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
- Tenere sul ghiaccio.

4.2.3. Frammentazione enzimatica, riparazione finale e A-tailing

MATERIALI

- gDNA a doppio filamento diluito e condizionato in 35 µl
- Pre-mix di reazione FX
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

PREPARAZIONE

- Programmare il termociclatore per FX Fragmentation con le seguenti impostazioni:

	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (IN MINUTI)
Coperchio	70	-
Passaggio 1	4	1
Passaggio 2	32	5
Passaggio 3	65	30
Mantenere	4	∞



- Avviare il programma FX Fragmentation. Quando il blocco raggiunge il passaggio 1 (4 °C), mettere in pausa il programma.

PROCEDURA



Importante: Tenere sempre i campioni e il pre-mix sul ghiaccio prima e dopo l'incubazione per bloccare la reazione enzimatica.

1. A seconda del numero di campioni, procedere come segue:
 - Se si stanno processando **4 campioni**, procedere al passaggio 2.
 - Se si stanno processando **8 o più campioni**, per facilitare il pipettaggio, creare una riserva di pre-mix di reazione FX aggiungendo i seguenti volumi a un nuovo set di strisce da 4 o 8 provette secondo il seguente schema:

NUMERO DI REAZIONI	8	12	16	24	32	48
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Pre-mix di reazione FX (in µl)	33	52,5	33	52,5	66	105

2. Assemblare la reazione come segue:
 - Utilizzando una pipetta multicanale, se si stanno processando 8 o più campioni, aggiungere 15 µl di pre-mix di reazione FX a ciascuno dei 35 µl di campioni di gDNA (totale di 50 µl in strisce da 4 o 8 provette).
 - Usando una pipetta impostata a 40 µl (multicanale se si stanno processando 8 o più campioni), mescolare accuratamente pipettando su e giù per 5 volte e centrifugare brevemente in una microcentrifuga.
3. Mettere nel termociclatore e continuare il programma FX Fragmentation.

Procedere immediatamente alla legatura.

4.2.4. Legatura

MATERIALI

- Prodotti di reazione della frammentazione FX in 50 µl ciascuno
- Pre-mix di legatura
- Adattatori a doppio indice
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml



PREPARAZIONE

- Rimuovere la piastra adattatrice a doppio indice da 4 °C (trasferita da -20 °C a 4 °C in precedenza) e far centrifugare brevemente la piastra per raccogliere tutto il liquido. Fare riferimento all'Appendice 1 per il rispettivo formato della piastra.
- Durante la frammentazione FX, preparare nuove strisce PCR con 5 µl di diversi adattatori a doppio indice per ciascuna provetta come da strategia di indicizzazione, secondo lo schema seguente:

NUMERO DI REAZIONI	4	8	12	16	24	32	48
Striscia PCR	4 provette	4 provette	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Numero di strisce	1	2	3	2	3	4	6

- Impostare il termociclatore a 20 °C (coperchio aperto)

PROCEDURA

1. A seconda del numero di campioni, procedere come segue:
 - Se si stanno processando **4 campioni**, procedere al passaggio 2.
 - Se si stanno processando **8 o più campioni**, per facilitare il pipettaggio, creare una riserva di legatura in un nuovo set di strisce PCR secondo il seguente schema:

NUMERO DI REAZIONI	8	12	16	24	32	48
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Pre-mix legatura (in µl)	100	160	100	160	200	320

2. Usando una pipetta multicanale, trasferire 50 µl del prodotto di reazione di ciascuna frammentazione FX alle strisce da 4 o 8 provette contenenti 5 µl di adattatori a doppio indice.
3. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
4. Usando una pipetta multicanale, se si stanno processando 8 o più campioni, aggiungere 45 µl di pre-mix di legatura al prodotto di reazione di ciascuna frammentazione FX (55 µl in ciascuna provetta della striscia da 4 o 8 provette).
5. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
6. Incubare nel termociclatore a 20 °C per 15 minuti (coperchio aperto).



Importante: Al termine della legatura, non posizionare le strip sul ghiaccio, poiché ciò potrebbe ridurre l'efficienza di legame del DNA alle sfere.



Procedere alla pulizia post legatura.

4.2.5. Pulizia post-legatura

MATERIALI

- Prodotti di reazione legati in 100 µl ciascuno
- Sfere AMPure XP equilibrate a temperatura ambiente
- Etanolo appena preparato all'80%
- Acqua senza nucleasi
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

PROCEDURA

1. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 80 µl di sfere AMPure® XP ogni 100 µl di prodotti di reazione di legatura. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte.
2. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
3. Posizionare le strisce da 4 o 8 provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
4. Eliminare accuratamente 170 µl del surnatante usando una pipetta multicanale.

Tenere le provette sul rack magnetico per i passaggi successivi.

5. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 170 µl di etanolo all'80% alle sfere. Incubare da 30 secondi a 1 minuto.
6. Eliminare accuratamente l'etanolo usando una pipetta multicanale.
7. Ripetere i passaggi 5 e 6 una volta.
8. Rimuovere l'etanolo residuo usando una pipetta multicanale P10 o P20.
9. Asciugare all'aria le sfere a temperatura ambiente per 5 minuti. Non asciugare troppo le sfere perché questo potrebbe diminuire la quantità di DNA recuperato.

Rimuovere le provette dal rack magnetico.

10. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 105 µl di acqua senza nucleasi alle sfere e attendere qualche secondo.
Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
11. Posizionare le strisce da 4 o 8 provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
12. Utilizzando una pipetta multicanale, trasferire accuratamente 100 µl del surnatante in nuove strisce etichettate da 4 o 8 provette.

Procedere alla selezione dimensione doppia



4.2.6. Selezione dimensione doppia

MATERIALI

- Prodotti di reazione legati in 100 µl ciascuno
- Sfere AMPure XP equilibrate a temperatura ambiente
- Etanolo appena preparato all'80%
- IDTE
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

PROCEDURA

1. Utilizzando una pipetta multicanale, aggiungere 60 µl di sfere AMPure XP a ciascuno dei 100 µl di prodotti di reazione legati. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte.
2. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
3. Posizionare le strisce da 4 o 8 provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
4. Utilizzando una pipetta multicanale, trasferire accuratamente 140 µl del surnatante in nuove strisce etichettate da 4 o 8 provette contenenti 20 µl di sfere AMPure XP. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte.
5. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
6. Posizionare le strisce da 4 o 8 provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti per 3 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
7. Eliminare accuratamente 150 µl del surnatante usando una pipetta multicanale.

Tenere le provette sul rack magnetico per i passaggi successivi.

8. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 170 µl di etanolo all'80% alle sfere.
Lasciar riposare le provette da 30 secondi a 1 minuto.
9. Eliminare accuratamente l'etanolo usando una pipetta multicanale.
10. Ripetere i passaggi 8 e 9 una volta.
11. Rimuovere l'etanolo residuo usando una pipetta multicanale P10 o P20.
12. Asciugare all'aria le sfere a temperatura ambiente per 4 minuti. Non asciugare troppo le sfere perché questo potrebbe diminuire la quantità di DNA recuperato.
Rimuovere le provette dal rack magnetico.
13. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 20 µl di IDTE alle sfere. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.

Procedere all'amplificazione della libreria.



4.2.7. Amplificazione della libreria

MATERIALI

- Prodotti di legatura selezionati a doppia dimensione e sfere risospese in 20 µl di IDTE ciascuno.
- Pre-mix PCR

PREPARAZIONE

Programmare il termociclatore per l'amplificazione della libreria con le seguenti impostazioni:

	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (IN SECONDI)	
Coperchio	99	-	
Passaggio 1: Denaturazione iniziale	98	120	
Passaggio 2: Denaturazione	98	20	8 cicli
Passaggio 3: Annealing	60	30	
Passaggio 4: Estensione	72	30	
Passaggio 5: Estensione finale	72	60	
Mantenere	10	∞	

PROCEDURA

1. A seconda del numero di campioni, procedere come segue:
 - Se si stanno processando **4 campioni**, procedere al passaggio 2.
 - Se si stanno processando **8 o più campioni**, procedere come segue:
 - a. Per facilitare il pipettaggio, creare una riserva di pre-mix PCR aggiungendo i seguenti volumi a un nuovo set di strisce da 4 o 8 provette secondo il seguente schema:

NUMERO DI REAZIONI	8	12	16	24	32	48
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Pre-mix PCR (in µl)	65	100	65	100	130	200



2. Assemblare la reazione come segue:
 - Utilizzando una pipetta multicanale, se si stanno processando 8 o più campioni, aggiungere 30 µl di pre-mix PCR ai prodotti di legatura selezionata a doppia dimensione e alle sfere (volume totale 50 µl = 30 µl + 20 µl).
 - Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
3. Mettere le provette nel termociclatore ed eseguire il programma Amplificazione della libreria.



Suggerimento: Punto di arresto sicuro durante la notte a 4 °C.

4.2.8. Pulizia post-amplificazione

MATERIALI

- Prodotti di reazione PCR in 50 µl ciascuno
- Sfere AMPure XP equilibrate a temperatura ambiente
- Etanolo appena preparato all'80%
- Acqua senza nucleasi
- Provette a basso legame con il DNA per la conservazione delle librerie

PROCEDURA

1. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 50 µl di sfere AMPure XP ogni 50 µl di prodotto PCR. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte.
2. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
3. Posizionare le strisce da 4 o 8 provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
4. Eliminare accuratamente 90 µl del surnatante usando una pipetta multicanale.

Tenere le provette sul rack magnetico per i passaggi successivi.

5. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 170 µl di etanolo all'80% alle sfere.
Lasciar riposare le provette da 30 secondi a 1 minuto.
6. Eliminare accuratamente l'etanolo usando una pipetta multicanale.
7. Ripetere i passaggi 5 e 6 una volta.
8. Rimuovere l'etanolo residuo usando una pipetta multicanale P10 o P20.
9. Asciugare all'aria le sfere a temperatura ambiente per 5 minuti. Non asciugare troppo le sfere perché questo potrebbe diminuire la quantità di DNA recuperato.

Rimuovere le provette dal rack magnetico.



10. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 20 μ l di acqua senza nucleasi alle sfere. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare per raccogliere tutto il liquido.
11. Posizionare le strisce da 4 o 8 provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
12. Trasferire con attenzione 18 μ l di surnatante (si consiglia di trasferire due volte 9 μ l in questo passaggio) in una nuova provetta etichettata per la conservazione della libreria.



Suggerimento: Punto di arresto sicuro durante la notte a 4 °C o -20 °C per una conservazione più lunga.

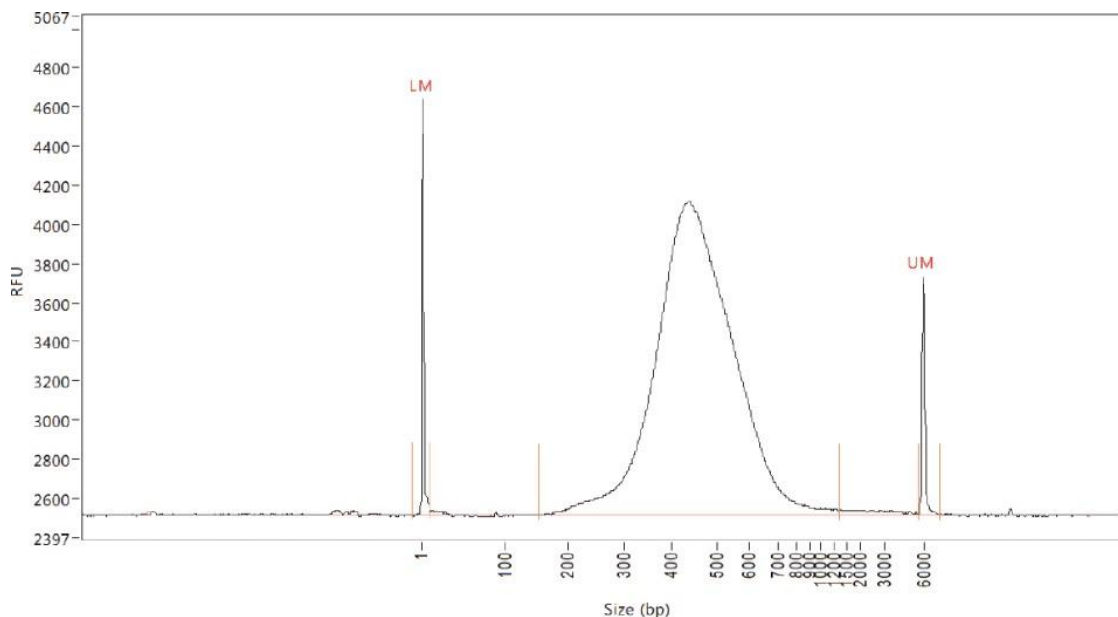
4.2.9. Quantificazione individuale della libreria e controllo qualità

MATERIALI

- Attrezzatura e reagenti per la quantificazione fluorometrica
- Sistema di elettroforesi capillare
- Acqua senza nucleasi
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

PROCEDURA

1. Preparare una diluizione quadrupla di ciascuna libreria con acqua senza nucleasi (ad es., 2 μ l di biblioteca in 6 μ l di acqua senza nucleasi).
2. Quantificare le librerie con un metodo fluorometrico (ad es. quantificazione con Qubit HS utilizzando 2 μ l della diluizione quadrupla della libreria precedente).
3. Controllare la qualità delle librerie analizzandone il profilo tramite elettroforesi capillare. I frammenti di DNA della libreria dovrebbero avere una distribuzione delle dimensioni fra 300 bp e 700 bp.



Esempio di distribuzione della libreria di DNA ottenuta con sistema di elettroforesi capillare Agilent Fragment Analyzer. Marker superiore (UM), marker inferiore (LM)

4.3. Cattura

4.3.1. Pooling della libreria

MATERIALI

- Librerie individuali
- Human Cot DNA
- Universal Blockers - TS Mix
- Provette a basso legame con il DNA da 1,5 ml

PROCEDURA

1. Preparare un pre-mix di quanto segue in una provetta a basso legame con il DNA:

NUMERO DI CATTURE (Fare riferimento alla tabella del punto 3)	1	2	3	4
Human Cot DNA (in μ l)	5	11	16,5	22
Universal Blockers - TS Mix (in μ l)	2	4,4	6,6	8,8



2. Se si stanno eseguendo due o più catture, pipettare 7 µl del pre-mix precedente in singole provette a basso legame con il DNA.
3. Alle singole provette contenenti il pre-mix precedente, aggiungere un pool di librerie individuali secondo il formato del kit:

FORMATO DEL KIT	Kit da 16 campioni	Kit da 32 campioni	Kit da 48 campioni	Kit da 96 campioni
Numero di librerie individuali per cattura	4	8	12	12
Quantità di ciascuna libreria per cattura	300 ng	200 ng	150 ng	150 ng
Quantità totale di librerie per cattura	1200 ng	1600 ng	1800 ng	1800 ng

4. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
5. Asciugare ciascun mix utilizzando un concentratore di DNA sotto vuoto fino a quando il mix sarà completamente liofilizzato. Utilizzare un riscaldamento leggero (45-50 °C) per accelerare la liofilizzazione.



Suggerimento: Punto di arresto sicuro durante la notte a -20 °C.

4.3.2. Ibridazione

MATERIALI

- Librerie liofilizzate
- 2x tampone di ibridazione
- Potenziatore per tamponi di ibridazione
- Hereditary Cancer Solution probes
- Acqua senza nucleasi
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml
- Provette da 1,5 ml
- 10x tampone di lavaggio I
- 10x tampone di lavaggio II
- 10x tampone di lavaggio III
- 10x tampone di lavaggio stringente
- 2x tampone di lavaggio sfere

PREPARAZIONE

1. Preriscaldare il termociclatore a 95 °C (impostare il coperchio a 99 °C).
2. Dopo i 10 minuti di denaturazione, passare direttamente a 65 °C (impostare il coperchio a 75 °C).



Importante: Si raccomanda l'uso di diversi termociclatori per incubazioni a 95 °C e 65 °C, se disponibili.



PROCEDURA

1. Preparare un pre-mix di ibridazione in base al numero di reazioni di cattura:

NUMERO DI CATTURE	1	2	3	4
2x tampone di ibridazione (in µl)	8,5	18,7	28,05	37,4
Potenziatore per tamponi di ibridazione (in µl)	3,4	7,48	11,22	14,96
Acqua senza nucleasi (in µl)	1,1	2,42	3,63	4,84

2. Risospendere il pellet liofilizzato in 13 µl di pre-mix di ibridazione.
3. Trasferire il pellet risospeso in una provetta PCR (una provetta per ciascuna reazione di cattura).
4. Incubare nel termociclatore a 95 °C per 10 minuti.



Importante: Non lasciare che la temperatura della provetta scenda sotto i 65 °C dal punto 3 al punto 5: questo può portare a un annealing errato della sonda.

5. Spostare la provetta PCR dal termociclatore da 95 °C a 65 °C, quindi aggiungere 4 µl di sonde al mix. Usando una pipetta impostata a 13 µl, mescolare accuratamente pipettando su e giù per 5 volte.
6. Incubare nel termociclatore a 65 °C per 4 ore.
7. Preparare in anticipo 1x soluzioni di lavoro dei diversi tamponi di lavaggio come descritto nelle pagine seguenti per permettere loro di raggiungere l'equilibrio durante la reazione di ibridazione.

PREPARAZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO PER 1 REAZIONE

TAMPONE	TAMPONE STOCK (µl)	ACQUA (µl)	VOLUME FINALE 1X (µl)
10x tampone di lavaggio I	33	297	330
10x tampone di lavaggio II	22	198	220
10x tampone di lavaggio III	22	198	220
10x tampone di lavaggio stringente	44	396	440
2x tampone di lavaggio sfere	275	275	550



Importante: Preriscaldare 1x tampone stringente e un'aliquota di 110µl di 1x tampone di lavaggio I a 65 °C in un termoblocco o a bagnomaria per almeno 2 ore. Tenere il restante tampone di lavaggio I a temperatura ambiente.



PREPARAZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO PER 2 REAZIONI

TAMPONE	TAMPONE STOCK (μl)	ACQUA (μl)	VOLUME FINALE 1X (μl)
10x tampone di lavaggio I	66	594	660
10x tampone di lavaggio II	44	396	440
10x tampone di lavaggio III	44	396	440
10x tampone di lavaggio stringente	88	792	880
2x tampone di lavaggio sfere	550	550	1100



Importante: Preriscaldare 1x tampone stringente e un'aliquota di 220μl di 1x tampone di lavaggio I a 65 °C in un termoblocco o a bagnomaria per almeno 2 ore. Tenere il restante tampone di lavaggio I a temperatura ambiente.

PREPARAZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO PER 3 REAZIONI

TAMPONE	TAMPONE STOCK (μl)	ACQUA (μl)	VOLUME FINALE 1X (μl)
10x tampone di lavaggio I	99	891	990
10x tampone di lavaggio II	66	594	660
10x tampone di lavaggio III	66	594	660
10x tampone di lavaggio stringente	132	1188	1320
2x tampone di lavaggio sfere	825	825	1650



Importante: Preriscaldare 1x tampone stringente e un'aliquota di 330 μl di 1x tampone di lavaggio I a 65 °C in un termoblocco o a bagnomaria per almeno 2 ore. Tenere il restante tampone di lavaggio I a temperatura ambiente.

PREPARAZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO PER 4 REAZIONI

TAMPONE	TAMPONE STOCK (μl)	ACQUA (μl)	VOLUME FINALE 1X (μl)
10x tampone di lavaggio I	132	1188	1320
10x tampone di lavaggio II	88	792	880
10x tampone di lavaggio III	88	792	880
10x tampone di lavaggio stringente	176	1584	1760
2x tampone di lavaggio sfere	1100	1100	2200



Importante: preriscaldare 1x tampone stringente e aliquotare 440μl di 1x tampone di lavaggio I a 65 °C in un termoblocco o a bagnomaria per almeno 2 ore. Tenere il restante tampone di lavaggio I a temperatura ambiente.



4.3.3. Preparazione delle sfere di streptavidina

MATERIALI

- Sfere di streptavidina equilibrate a temperatura ambiente
- 1x tampone di lavaggio sfere
- Provette da 1,5 ml
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

PROCEDURA

Eseguire questi passaggi poco prima della fine dell'incubazione di ibridazione di 4 ore.

1. Miscelare le sfere a vortice per 15 secondi.
2. Trasferire 100 µl di sfere per cattura (200 µl per 2 reazioni, 300 µl per 3 reazioni, 400 µl per 4 reazioni) in una singola provetta da 1,5 ml.
3. Posizionare la provetta su un rack magnetico e lasciarla riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
4. Aggiungere 200 µl di 1x tampone di lavaggio sfere per cattura (400 µl per 2 reazioni, 600 µl per 3 reazioni, 800 µl per 4 reazioni) alla provetta. Agitare per 10 secondi.
5. Posizionare la provetta su un rack magnetico e lasciarla riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
6. Ripetere i passaggi 4 e 5 una volta.
7. Aggiungere 100 µl di 1x tampone di lavaggio sfere per cattura (200 µl per 2 reazioni, 300 µl per 3 reazioni, 400 µl per 4 reazioni) alla provetta. Agitare per 10 secondi.
8. Trasferire 100 µl di sfere pulite in una nuova provetta PCR (una provetta per ciascuna reazione di cattura).
9. Posizionare le provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti e lasciar riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.



Importante: Non lasciar asciugare le sfere.

Procedere immediatamente al legame dei target ibridati alle sfere.



4.3.4. Legame di target ibridati alle sfere

MATERIALI

- Sfere di streptavidina pulite in provette PCR
- Reazione(i) di ibridazione

PROCEDURA

Importante: Lavorare rapidamente per assicurarsi che la temperatura del campione rimanga vicino a 65 °C.

1. Rimuovere le reazioni di ibridazione dal termociclatore e centrifugare brevemente le provette e rimetterle sul termociclatore.
2. Posizionare le provette con le sfere di streptavidina lavate nel termociclatore (non più di due provette alla volta per evitare l'essiccazione delle sfere).
3. Per ciascuna reazione di ibridazione, trasferire 17 µl della soluzione di reazione di ibridazione in una provetta PCR contenente sfere pulite. Risospendere le sfere pipettando su e giù fino a quando la soluzione è omogenea.
4. Legare il DNA alle sfere mettendo le provette in un termociclatore a 65 °C (coperchio a 75 °C). Incubare per 45 minuti.
5. Durante l'incubazione, pipettare delicatamente su e giù le provette ogni 15 minuti per assicurarsi che le sfere rimangano in sospensione.

Procedere direttamente al lavaggio delle sfere di streptavidina per rimuovere il DNA non legato.



4.3.5. Lavare le sfere di streptavidina per rimuovere il DNA non legato

MATERIALI

- Target ibridati su sfere
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml
- Provette a basso legame con il DNA da 1,5 ml
- 1x tampone di lavaggio I (1/3 a 65 °C e 2/3 a temperatura ambiente)
- 1x tampone di lavaggio II
- 1x tampone di lavaggio III
- 1x tampone di lavaggio stringente (a 65 °C)
- Acqua senza nucleasi
- IDTE

PROCEDURA



Importante: Lavorare per assicurarsi che la temperatura rimanga vicina ai 65 °C per i passaggi da 1 a 7.

Nota: Se si lavora con 2 o più provette di cattura, lavorare in modo sfalsato dal passaggio 2 al passaggio 8, includendo quanto segue:

1. Quando si mette la prima provetta nel termoblocco a 65 °C per la prima incubazione di 5 minuti (passaggio 5), avviare un timer.
2. Iniziare a processare la seconda provetta.
3. Quando si posiziona la seconda provetta a 65 °C, notare il tempo che separa le provette e assicurarsi di rispettare questo intervallo durante i passaggi da 2 a 8 per garantire che ciascuna provetta incubi esattamente per 5 minuti a 65 °C con il lavaggio stringente.

1. Aggiungere 100 µl di 1x tampone di lavaggio I (a 65 °C) a ciascuna delle provette con target ibridato/sfere di streptavidina.
2. Lavorando con una provetta alla volta, risospendere e trasferire la miscela una alla volta in una nuova provetta a basso legame con il DNA da 1,5 ml. Se si lavora con due o più provette di cattura, lavorare in modo sfalsato come indicato sopra.
3. Posizionare la provetta su un rack magnetico e lasciarla riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
4. Aggiungere 200 µl di 1x tampone di lavaggio stringente (a 65 °C) alla provetta.

Risospendere delicatamente le sfere pipettando su e giù.

La forte miscelazione delle sfere con il tampone di lavaggio stringente potrebbe diminuire la qualità della cattura.

5. Incubare a 65 °C per 5 minuti.
6. Posizionare la provetta su un rack magnetico e lasciarla riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.



7. Ripetere i passaggi da 4 a 6 una volta.

Lavorare a temperatura ambiente.

8. Aggiungere 200 µl di 1x tampone di lavaggio I (a temperatura ambiente) alla provetta. Risospendere delicatamente le sfere pipettando su e giù.

Nota: Se si lavora con 2 o più provette di cattura, da questo passaggio in avanti, processare tutte le provette allo stesso tempo.

9. Agitare per 2 minuti.
10. Posizionare le provette su un rack magnetico e lasciar riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
11. Aggiungere 200 µl di 1x tampone di lavaggio II a ciascuna provetta. Agitare per 1 minuto.
12. Posizionare le provette su un rack magnetico e lasciar riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
13. Aggiungere 200 µl di 1x tampone di lavaggio III a ciascuna provetta. Agitare per 30 secondi. Centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
14. Posizionare le provette su un rack magnetico e lasciar riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
15. Aggiungere 200 µl di 1x IDTE a ciascuna provetta. Risospendere le sfere. Centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
16. Posizionare le provette su un rack magnetico e lasciar riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
17. Rimuovere tutto il liquido rimanente utilizzando una pipetta P10 o P20.
18. Aggiungere 20 µl di acqua senza nucleasi a ciascuna provetta, risospendere e trasferire la miscela di sfere/acqua in una nuova provetta PCR.

4.3.6. Amplificazione post-cattura

MATERIALI

- Sospensione di sfere di streptavidina/acqua senza nucleasi (20 µl)
- 2x KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix
- 10x Primer Mix per amplificazione librerie
- Acqua senza nucleasi



PREPARAZIONE

Programmare il termociclatore per l'amplificazione post-cattura con le seguenti impostazioni:

	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (IN SECONDI)	
Coperchio	99	-	14 cicli
Passaggio 1: Denaturazione iniziale	98	45	
Passaggio 2: Denaturazione	98	15	
Passaggio 3: Annealing	60	30	
Passaggio 4: Estensione	72	30	
Passaggio 5: Estensione finale	72	60	
Mantenere	10	∞	

PROCEDURA

1. Preparare il pre-mix PCR come segue:

PRE-MIX PCR				
Numero di reazioni	1	2	3	4
2x KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix (in µl)	25	55	82,5	110
10x Primer Mix per amplificazione librerie (in µl)	2,5	5,5	8,25	11
Acqua senza nucleasi (in µl)	2,5	5,5	8,25	11

2. Aggiungere 30 µl di pre-mix PCR a ciascuna sospensione di sfere. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
3. Posizionare le provette nel termociclatore ed eseguire il programma di amplificazione post-cattura.



Suggerimento: Punto di arresto sicuro durante la notte a 4 °C o -20 °C per una conservazione più lunga.



4.3.7. Pulizia post-cattura dell'amplificazione

MATERIALI

- Prodotti di reazione PCR in 50 µl ciascuno
- Sfere AMPure® XP equilibrate a temperatura ambiente
- Etanolo appena preparato all'80%
- IDTE
- Provette a basso legame con il DNA per la conservazione delle librerie

PROCEDURA

1. Aggiungere 50 µl di sfere AMPure® XP a ciascuno dei 50 µl di prodotti di reazione PCR. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte.
2. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
3. Posizionare le provette su un rack magnetico per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
4. Eliminare accuratamente 90 µl del surnatante usando una pipetta multicanale.

Tenere le provette sul rack magnetico per i passaggi successivi.

5. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 170 µl di etanolo all'80% alle sfere. Lasciar riposare le provette da 30 secondi a 1 minuto.
6. Eliminare accuratamente l'etanolo.
7. Ripetere i passaggi 5 e 6 una volta.
8. Rimuovere l'etanolo residuo usando una pipetta P10 o P20.
9. Asciugare all'aria le sfere a temperatura ambiente per 5 minuti. Non asciugare troppo le sfere perché questo potrebbe diminuire la quantità di DNA recuperato.

Rimuovere le provette dal rack magnetico.

10. Aggiungere 20 µl di IDTE alle sfere. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
11. Posizionare le provette su un rack magnetico per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
12. Trasferire con attenzione 18 µl di surnatante (si consiglia di trasferire due volte 9 µl in questo passaggio) in una nuova provetta etichettata per la conservazione della libreria.



Suggerimento: Punto di arresto sicuro durante la notte a 4 °C o -20 °C per una conservazione più lunga.



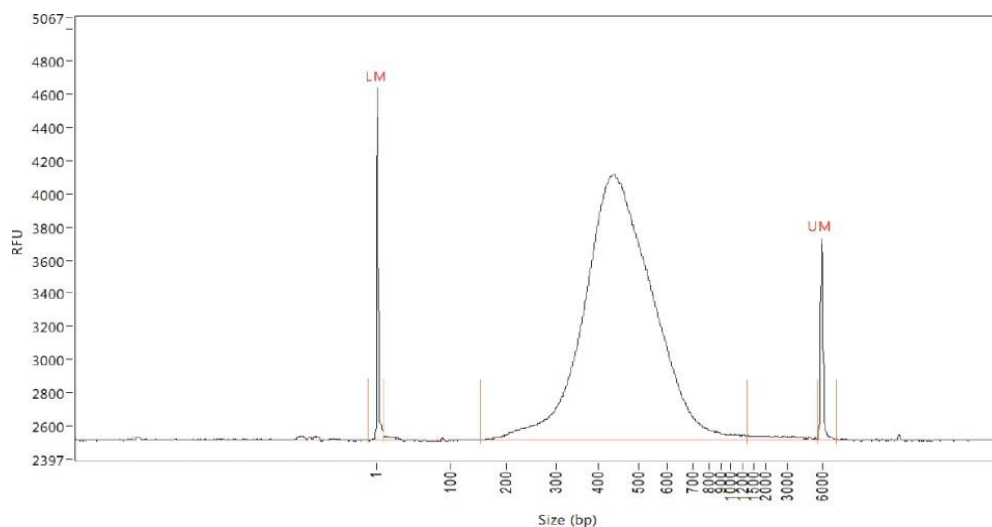
4.3.8. Quantificazione finale della libreria e controllo qualità

MATERIALI

- Attrezzatura e reagenti per la quantificazione fluorometrica
- Sistema di elettroforesi capillare

PROCEDURA

1. Quantificare tutti i pool della libreria catturati con un metodo fluorometrico (ad es. quantificazione con Qubit HS utilizzando 2 µl della libreria).
2. Controllare la qualità del pool di librerie catturato analizzandone il profilo tramite elettroforesi capillare. I frammenti di DNA della libreria dovrebbero avere una distribuzione delle dimensioni fra 300 bp e 700 bp.



Esempio di distribuzione delle dimensioni del pool della libreria catturato ottenuta con sistema di elettroforesi capillare Agilent Fragment Analyzer. Marker superiore (UM), marker inferiore (LM)



4.4. Sequenziamento

5.4.1. Preparazione della libreria per il sequenziamento

MATERIALI

- Kit di reagenti Illumina MiSeq® Reagent Kit v3
- Librerie finali catturate
- Tampone EBT o simile

PROCEDURA

1. Determinare la molarità di ciascun pool con la dimensione media della libreria (dimensione del picco in coppie di basi) e la concentrazione (ng/μl) ottenuta durante il passaggio 5.3.8 come segue:

$$\text{Molarità della libreria (nM)} = \frac{\text{Concentrazione della libreria (ng/μl)}}{\text{Dimensione media in coppie di basi} \times 649,5} \times 10^6$$

2. Diluire ciascun pool a 4 nM e mescolarli in quantità uguali (ad es. 5 μl di ciascuno). Mescolare bene e usare questa diluizione secondo le raccomandazioni sulla denaturazione dello standard Illumina®.
3. Caricare una diluizione di 10 pM delle librerie denaturate su MiSeq®.
4. Le letture minime raccomandate sono 1,0 milioni di letture per campione, con una lunghezza di lettura di 300 bp.

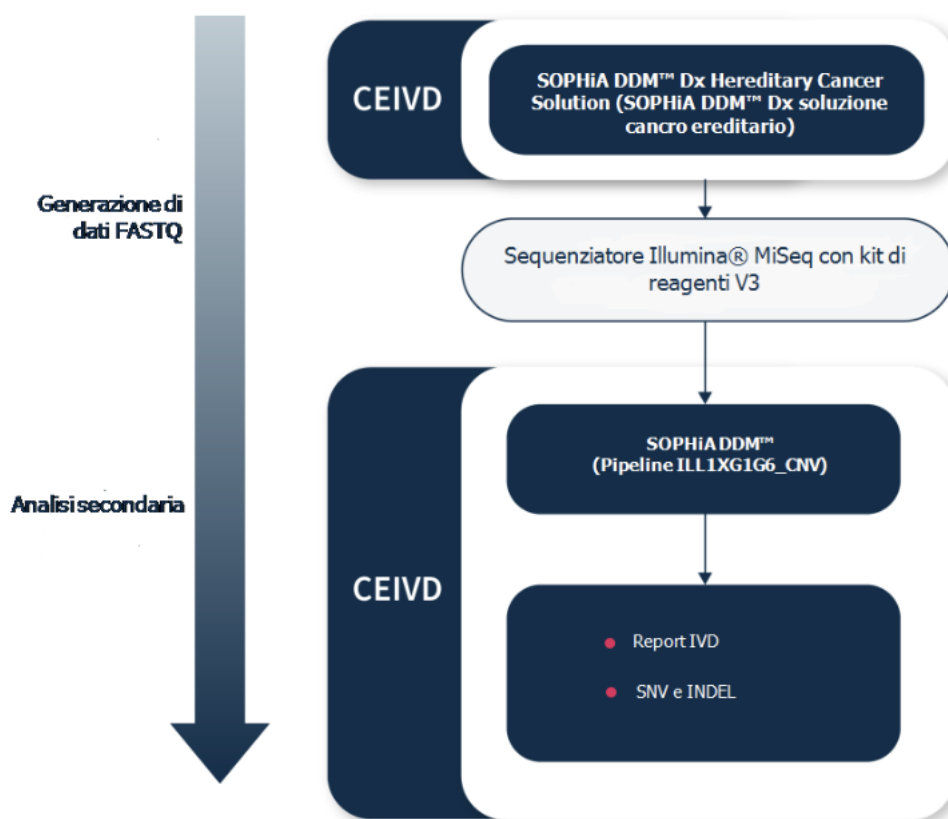


5. PROCEDURA DI ANALISI

5.1. Modalità SOPHiA DDM™ Dx Istruzioni per l'installazione

Per utilizzare la modalità SOPHiA DDM™ Dx non è necessaria alcuna installazione. Verrà inviata un'e-mail con le istruzioni e un link alla modalità SOPHiA DDM™ Dx. Per informazioni sulla gestione dell'account, la compatibilità del browser e altri avvisi importanti, consultare il manuale utente della modalità SOPHiA DDM™ Dx. I documenti di supporto sono disponibili anche direttamente in modalità SOPHiA DDM™ Dx.

5.2. Descrizione del flusso di lavoro di analisi per la generazione di risultati IVD



Descrizione del flusso di lavoro di analisi per la SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution

Si invita a fare riferimento al manuale utente della modalità SOPHiA DDM™ Dx per la descrizione completa del flusso di lavoro di upload.



6. LIMITAZIONI, AVVERTENZE E PRECAUZIONI

AVVERTENZE GENERALI

- Per le istruzioni dettagliate sul software, consultare il manuale utente della Modalità SOPHiA DDM™ Dx.
- Se la manipolazione e il protocollo non vengono seguiti e se il sequenziatore, il multiplexing ecc. vengono alterati, le analisi non trovano corrispondenza nelle istruzioni per l'uso fornite.
- I dati forniti nel report sulla qualità (scaricabile dalla piattaforma della modalità SOPHiA DDM™ Dx) sono solo a titolo informativo e non sono destinati a essere utilizzati per le diagnosi.
- L'accuratezza dei risultati dell'analisi non può essere garantita. I laboratori di sequenziamento devono effettuare controlli di qualità dei campioni e segnalare i campioni non qualificati. Campioni non qualificati (ad es. un campione biottico insufficiente) possono compromettere i risultati. SOPHiA GENETICS non è responsabile dei risultati e delle decisioni prese sulla base di questi risultati.
- Per ottenere le prestazioni che ci si aspetta dal prodotto, occorre attenersi a standard e procedure di buona pratica di laboratorio e seguire rigorosamente le IFU. Per informazioni specifiche sulla sicurezza, consultare le schede di sicurezza dei materiali (MSDS) corrispondenti fornite con ciascun componente del prodotto.
- Per evitare la contaminazione del campione di DNA, devono essere predisposti locali fisicamente separati per il pre e il post PCR. Utilizzare sempre reagenti nuovi e DNA estratto e conservato correttamente. Per i dettagli su qualità e integrità del DNA, si rimanda alla sezione 5 delle IFU. Materiali e metodi del kit - Sezione 5.2.1 Preparazione del DNA genomico.
- Per eseguire l'esperimento, usare pipette calibrate correttamente e attrezzature di laboratorio adeguate.
- Non mischiare reagenti con numeri di lotto diversi
- Le decisioni sulla cura e il trattamento del paziente devono essere basate sul criterio indipendente del medico curante, prendendo in considerazione tutte le informazioni applicabili riguardanti la condizione del paziente, tra cui la storia clinica del paziente e della famiglia, esami fisici, le informazioni fornite da altri test diagnostici e le preferenze del paziente, in conformità con gli standard sanitari della comunità.

LIMITAZIONI GENERALI

- La scarsa qualità dei dati dovuta a problemi nella preparazione del campione o nel passaggio di sequenziamento può confondere l'analisi dei dati e generare falsi positivi e/o falsi negativi.
- L'assenza di una variante nel report non esclude la presenza della stessa con valori al di sotto dei limiti di rilevamento del test.
- Il cross-talk del campione dovuto all'index hopping può determinare chiamate di varianti di Falsi Positivi. Nella maggior parte dei casi, queste chiamate saranno rilevate con una frazione di variante bassa (0,1-2%) e quindi filtrate come varianti a bassa affidabilità. Il cross-talk del campione dovuto all'index hopping può essere aggravato dai seguenti fattori e determinare frazioni di varianti più alte:
 - Copertura molto alta in uno o pochi campioni a causa di problemi durante la quantificazione / normalizzazione del campione o amplificazioni geniche di alto livello



SNV / INDEL

- Il rilevamento delle varianti in questo prodotto è stato ottimizzato per il rilevamento degli SNV e degli INDEL corti (fino a 2/3 della lunghezza della lettura). Si noti che qualsiasi altro tipo di alterazione può essere mancato dall'algoritmo.
 1. Le fusioni o inversioni geniche non possono essere rilevate.
 2. Delezioni o inserzioni con un breakpoint al di fuori della regione target potrebbero non essere rilevate.
 3. Le grandi delezioni, più lunghe di circa 5.000 bp, potrebbero non essere mappate correttamente e potrebbero mancare.
 4. Inserzioni grandi, più lunghe di circa 2/3 della lunghezza della lettura, potrebbero essere mancate a causa di una lunghezza di ancoraggio insufficiente per l'identificazione del sito di inserzione.
 5. Le duplicazioni che non sono completamente coperte da letture complete (inclusa la sequenza di riferimento duplicata) potrebbero essere mancate.
 6. Nel caso di una duplicazione in tandem di lunghezza superiore a 1/3 della lunghezza della lettura, il numero esatto di ripetizioni in tandem potrebbe non essere determinato.
 7. Potrebbero essere rilevate inserzioni Alu più lunghe di 2/3 della lunghezza della lettura se corrispondono ad almeno una sequenza in un database di sequenze Alu note. Diversamente verranno mancate.
 8. La quantificazione di inserzioni più lunghe della lunghezza della lettura può aumentare il rischio di sovrastimare le frazioni di varianti.
- Il rilevamento delle varianti in questo prodotto è stato ottimizzato sulle regioni definite come "regioni target". Si noti che le regioni al di fuori di questa definizione potrebbero generare falsi negativi e/o falsi positivi.
- Per una prestazione stabile dell'analisi dei dati, si raccomanda una copertura di almeno 200x. Si raccomanda una copertura minima di 50x per una chiamata affidabile delle varianti. Le varianti potrebbero essere mancate in regioni che mostrano una copertura inferiore.
- Le varianti possono essere mancate o chiamate erroneamente a causa di limitazioni nel design del kit
- Le varianti nelle regioni per le quali il relativo frammento di DNA non viene estratto dalle sonde non possono essere rilevate dal prodotto. La cattura delle varianti può essere limitata da:
 1. INDEL che influenzano l'ibridazione delle sonde. Questo può portare all'assenza di rilevamento o a una stima errata della frazione della variante.
 2. La presenza di una o più mutazioni aggiuntive nella regione target della sonda sullo stesso allele.
- SNV o INDEL in omopolimeri di lunghezza dieci o superiore non possono essere chiamati in modo attendibile dal momento che il loro rilevamento è confuso da un elevato rumore di fondo.
- Potrebbero essere segnalate varianti deletion-insertion (delins) complesse come varianti multiple nel caso in cui vengano rappresentate nell'allineamento come più varianti più piccole separate da più di 2 nucleotidi.
- Le regioni problematiche nell'Appendice 4 sono regioni introniche all'interno del target e potrebbero causare incertezze nella chiamata delle varianti. Questo potrebbe essere legato alla tecnologia di sequenziamento. Una variante rilevata in questa regione verrà designata come "bassa" nella tabella di attendibilità in SOPHiA DDM™.



- Le regioni contrassegnate nell'Appendice 4 presentano caratteristiche che rendono inattendibile il rilevamento delle varianti. Vengono segnalate con avvertenze nell'interfaccia SOPHiA DDM™, e le varianti rilevate in queste regioni vengono contrassegnate con un flag.
- Le regioni con un'alta omologia di sequenza possono causare incertezza nella mappatura e il rischio di perdere o chiamare varianti errate.
- Le varianti potrebbero essere rappresentate in forme diverse in una data regione. Se una variante è rappresentata in due modi diversi all'interno delle letture allineate o parzialmente non allineate in alcune di esse, la frazione di variante potrebbe essere sottostimata, oppure la variante potrebbe essere mancata a causa della bassa frazione di variante.
- Nel caso di inserzioni/duplicazioni multiple presenti all'interno della stessa regione, non tutte potrebbero essere riportate correttamente. In particolare, quando un'inserzione più piccola è completamente contenuta all'interno di un'inserzione più grande, potrebbe non esserci alcuna lettura che identifichi in modo univoco l'inserzione più piccola, e quest'ultima potrebbe essere mancata e potrebbe essere riportata solo l'inserzione più grande.
- Nel caso di inserzioni/duplicazioni multiple presenti all'interno della stessa regione, non tutte potrebbero essere quantificate correttamente. In particolare, se un'inserzione più piccola è completamente contenuta all'interno di un'inserzione più grande, potrebbe non esserci alcuna lettura che identifichi univocamente l'inserzione più piccola e la frazione di variante riportata per l'inserzione più piccola potrebbe essere sottostimata e la frazione di variante dell'inserzione più grande sovrastimata.
- La presenza di mosaicismo genetico nel paziente potrebbe portare a un'interpretazione imprecisa dei risultati.



7. VALUTAZIONE DELLA PERFORMANCE NON CLINICHE

7.1. CARATTERISTICHE DELLA PERFORMANCE ANALITICA

Il seguente studio è diviso in due parti. La prima parte descrive lo studio di valutazione della performance effettuato per SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0 e il kit amplificazione libreria KAPA™. La seconda parte contiene lo studio di non regressione tra SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0 e 1.1 utilizzando il kit amplificazione libreria KAPA™ o il SOPHiA GENETICS DNA Library Prep I Kit. Quest'ultima parte include le informazioni relative al gene APC compreso in SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1.

7.2. METODI

Informazioni generali

In questo studio, sono state valutate le prestazioni del kit SOPHiA DDM™ Dx HCS e della pipeline SOPHiA DDM™ Dx ILL1XG1G6_CNV con dati generati su uno strumento Illumina MiSeq® utilizzando il test SOPHiA DDM™ Dx HCS. Sono stati applicati i filtri predefiniti relativi alla bassa copertura (50X cut-off), alla frazione di varianti (20% cut-off per SNV, 15% cut-off per INDEL) e alla lunghezza della regione omopolimerica (cut-off 10 bp). Per ciascun campione sono state confrontate le varianti rilevate dalla pipeline con le varianti confermate “gold standard” fornite da ciascuno dei centri di sequenziamento. Le varianti rilevate al di fuori delle regioni target non sono state considerate.

Dal momento che il pannello SOPHiA DDM™ Dx HCS riguarda l'individuazione delle varianti germinali, le valutazioni del limite di rilevazione (LOD) non sono state necessarie poiché le frazioni di varianti previste sono significativamente più alte dei possibili livelli di rumore del sequenziamento.

Definizioni di sensibilità, specificità, accuratezza, precisione, ripetibilità e riproducibilità

È stata presa in considerazione ciascuna posizione analizzata sia con il metodo di riferimento che con il metodo che combina l'uso dello strumento MiSeq® e del pannello SOPHiA DDM™ Dx HCS per calcolare parametri di performance analitica come la sensibilità, la specificità, l'accuratezza, la precisione e la coerenza.

Per tutte le posizioni coperte dal pannello SOPHiA DDM™ Dx HCS e per le quali erano disponibili informazioni di riferimento, sono stati determinati i numeri delle seguenti categorie: I veri positivi (TP) e i veri negativi (TN) sono presenti in entrambi i set, i falsi positivi (FP) sono presenti solo nelle varianti rilevate da SOPHiA DDM™ Dx e i falsi negativi (FN) sono presenti solo nella tabella delle varianti confermate. Tutte le posizioni schermate (TP+FP+TN+FN) sono state determinate sottraendo le posizioni indeterminate dalla regione target:

Regione target del pannello SOPHiA DDM™ Dx HCS: CDS ± 25bp (vedere l'Appendice 4 per l'elenco completo delle regioni target e delle regioni problematiche e contrassegnate applicabili).

Regioni non definite: Regioni con copertura <50x

Regioni problematiche identificate o regioni con pseudogeni come specificato nella nostra documentazione per la pipeline SOPHiA DDM™ Dx HCS (Appendice 4).

Inoltre, gli INDEL situati in regioni omopolimeriche maggiori di 9 bp sono stati esclusi dai calcoli.



Tutti i parametri sono stati calcolati con le seguenti formule:

1. La **sensibilità** è stata determinata come percentuale delle varianti confermate rilevate:

$$\text{Sensibilità} = \frac{TP}{TP+FN} \times 100$$

2. La **specificità** è stata determinata come percentuale delle posizioni negative correttamente identificate come negative:

$$\text{Specificità} = \frac{TN}{TN+FP} \times 100$$

(con TN= tutte le posizioni schermate-TP-FP-FN)

3. L'**accuratezza** è stata determinata come percentuale delle chiamate corrette (positive e negative):

$$\text{Accuratezza} = \frac{TP+TN}{TP+FP+TN+FN} \times 100$$

4. La **precisione** è stata determinata come percentuale delle chiamate positive corrette da tutte le chiamate positive:

$$\text{Precisione} = \frac{TP}{TP+FP} \times 100$$

5. La **ripetibilità del sequenziamento** è stata determinata, per ciascuna coppia di repliche intra-prova A e B, come percentuale delle basi ben definite (SP) in entrambi i campioni tra le basi ben definite in almeno un campione. Le basi sono considerate ben definite se sono sufficientemente coperte e non contengono chiamate di varianti a bassa attendibilità.

$$\text{Ripetibilità del sequenziamento} = \frac{\sum_{ie} [SP_A \cap SP_B]^1}{\sum_{ie} [SP_A \cup SP_B]^1}$$

6. **Ripetibilità della variante** - per calcolare la frazione di basi in entrambi i replicati vengono prese in considerazione tutte le posizioni ben definite in entrambi i replicati. Date le repliche intra-prova A e B con posizioni ben definite SPA e SPB, SPA[i] e SPB[i] rappresentano lo stato della variante nella posizione i. Essendo dx l'operatore che restituisce 1 quando x=0 e 0 quando x≠0, la ripetibilità della variante viene definita come:

$$\text{Ripetibilità della variante} = \frac{\sum_{ie} [SP_A \cap SP_B]^{\delta_{SPA[i]-SPB[i]}}}{\sum_{ie} [SP_A \cap SP_B]^1}$$

7. La **ripetibilità** è stata definita come il prodotto delle due misure precedenti:

$$\text{Ripetibilità} = \text{Ripetibilità della variante} \times \text{Ripetibilità del sequenziamento} \times 100$$

8. La **riproducibilità** è stata definita in modo equivalente alla ripetibilità (vedere le formule (5)-(7)) per le repliche intra-prova A e B.



TP, FP, TN e FN sono stati calcolati sommando tutti i campioni di ciascuna prova. Sensibilità, specificità, accuratezza e precisione sono state calcolate sulla base di questi conteggi totali secondo le formule sopra indicate. Specificità, accuratezza e precisione sono state calcolate solo utilizzando campioni completamente caratterizzati a causa della mancanza di posizioni Vero negativo nei campioni parzialmente caratterizzati. La ripetibilità e la riproducibilità sono state calcolate utilizzando tutte le posizioni per tutti i campioni e tutte le prove considerate.

Per determinare gli intervalli di attendibilità in caso di sensibilità al 100% o altre misure, sono stati utilizzati i metodi descritti da Mattocks et al (2010) (Mattocks CJ et al, EuroGentest Validation Group, 2010). Nei casi in cui il criterio misurato è stato inferiore al 100%, è stato utilizzato il metodo esatto (Clopper, et al 1934) per ottenere l'intervallo di attendibilità sulla probabilità binomiale per la sensibilità, la specificità, l'accuratezza e la precisione (Clopper C et al, Biometrika, 1934). Per riflettere la vera diversità delle varianti, nei calcoli degli intervalli di attendibilità sono stati utilizzati solo i TP, FP, FN e TN unici.

7.3. DATI (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)

I campioni disponibili sono stati raggruppati in due categorie a seconda della caratterizzazione ad alta attendibilità disponibile per i confronti di riferimento. In primo luogo, i campioni parzialmente caratterizzati in cui sono state identificate varianti note ad alta attendibilità sono stati processati da SOPHiA GENETICS (sito A) o da partner esterni (siti da B a G). Questi risultati contengono una vasta casistica clinica rappresentativa e permettono di stimare la sensibilità per la denominazione delle varianti. Inoltre, sono stati inclusi i replicati per stimare la ripetibilità e la riproducibilità.

La seconda categoria di campioni è costituita da campioni di riferimento e clinici in cui sono state analizzate ampie porzioni delle regioni target SOPHiA DDM™ Dx HCS con una pipeline diagnostica marcata CE-IVD, SOPHiA DDM™ Dx—BRCA—MASTR Dx—GL—MiSeq o almeno due esperimenti NGS separati in cui vengono considerate solo le posizioni di consenso.

7.4. CONCLUSIONI GENERALI (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)

La seguente tabella riporta i riepiloghi completi delle varianti rilevate rispetto all'elenco delle varianti confermate (TP/FN) per ciascuna prova contenente campioni parzialmente caratterizzati.

Tabella 2. Riepiloghi delle varianti per ciascuna prova di campioni parzialmente caratterizzati

Prova	N. di campioni	TP	FN
SiteA_01	22	343	0
SiteA_02	10	11	0
SiteA_03	11	124	0
SiteA_04	5	5	0
SiteB_01	12	27	0
SiteB_02	8	9	0
SiteC_01	12	115	0
SiteC_02	12	72	0
SiteD	13	28	0



Prova	N. di campioni	TP	FN
SiteE	9	57	0
SiteF	18	286	0
SiteG	27	180	0
Totale	159	1257	0

La Tabella 3 seguente riporta i riepiloghi completi delle varianti rilevate rispetto all'elenco delle varianti confermate (TP/FN/FP) e delle posizioni di base senza varianti (TN) per ciascuna prova di campioni completamente caratterizzati.

Tabella 3. Riepiloghi delle varianti per ciascuna prova di campioni completamente caratterizzati

Prova	N. di campioni	TP	FN	FP	TN
Prova A	24	665	0	0	1515530
Prova B	24	329	0	2	583462
Prova C	11	439	0	0	980668
Totale	59	1433	0	2	3079660

La seguente tabella mostra le posizioni uniche della base TN e le varianti rilevate in questo studio di valutazione della performance. Il numero totale di posizioni di base nelle regioni analizzate è stato 90754 basi. Nello studio sono state rilevate 373 (trecentosettantatre) varianti uniche. I veri negativi sono stati uniti in tutti i campioni in cui erano disponibili dati di riferimento ad alta attendibilità e hanno coperto un totale di 90623 posizioni.

Tabella 4. Riepiloghi delle varianti in tutte le prove

TP	373
FP	2
FN	0
TN	90623



7.5. RISULTATI (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)

La combinazione dello strumento Illumina MiSeq®, del test SOPHiA DDM™ Dx HCS e di SOPHiA DDM™ porta a una performance osservata del 100% di sensibilità, 99,99% di specificità, 99,99% di accuratezza, 99,86% di precisione, 99,983% di ripetibilità e 99,93% di riproducibilità.

Tabella 5. Riepilogo della performance

N°	Misurazione della performance	Media	5° percentile
A	Tasso on-target	79,39%	[59,23%]
B	Uniformità	99,72%	[98,24%]

N°	Misurazione della performance	Osservato	[IC meno del 95%]*
1	Sensibilità	100%	[99,20%]
2	Specificità	99,99%	[99,99%]
3	Accuratezza	99,99%	[99,99%]
4	Precisione	99,86%	[96,42%]
5	Ripetibilità	99,98%	[99,98%]
6	Riproducibilità	99,93%	[99,92%]

* Gli IC al 95% sono stati calcolati sulle varianti uniche nello studio di valutazione delle prestazioni al fine di riflettere la reale diversità delle varianti.

** Gli IC al 95% sono stati calcolati su tutte le posizioni per tutti i campioni. La ripetibilità e la riproducibilità sono basate su repliche.

7.6. STUDIO PONTE (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1)

SOPHiA GENETICS HCS v1.0 è stato precedentemente testato a fondo su una vasta gamma di varianti confermate e utilizzando campioni ben caratterizzati. Abbiamo processato gli stessi campioni utilizzando diversi kit (SOPHiA GENETICS HCS v1.0 e SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1) e reagenti per la preparazione delle librerie KAPA™ Library Preparation Kit (KAPA™) o Qiaseq® FX DNA Library Kit (Qiagen®) per stabilire che:

- Le prestazioni utilizzando il kit SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 e la preparazione della libreria KAPA™ sono alla pari con le prestazioni utilizzando il kit SOPHiA GENETICS HCS v1.0 e la preparazione della libreria KAPA™.
- Le prestazioni ottenute utilizzando il kit SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 e la preparazione della libreria Qiagen sono anch'esse alla pari con SOPHiA GENETICS HCS v1.0 e la preparazione della libreria KAPA™.
- La performance analitica all'interno delle nuove regioni target di SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 (APC CDS+/- 25bp) è elevata.



Tabella 6: Confronto tra kit - riepilogo della performance

N°	Misurazione della performance	Osservato	[IC meno del 95%]**
1	Riproducibilità KAPA™ v1.1 rispetto a KAPA™ v1.0 (3 prove su 59 campioni)	99,99%	[99,99%]
2	Riproducibilità Qiagen® v1.1 rispetto a KAPA™ v1.0 (3 prove su 23 campioni)	99,99%	[99,99%]
3	Riproducibilità KAPA™ (2 prove su 24 campioni)	99,95%	[99,95%]
4	Riproducibilità Qiagen® (2 prove su 23 campioni)	99,99%	[99,99%]
5	Riproducibilità KAPA™-Qiagen® (2 prove su 23 campioni)	99,99%	[99,99%]

** Gli IC al 95% sono stati calcolati su tutte le posizioni per tutti i campioni. La riproducibilità si basa sulle repliche.

7.7. CONCLUSIONE

Sulla base dei dati analizzati internamente, il kit SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 ha raggiunto prestazioni simili al precedente SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0 in termini di tassi on-target, regioni coperte, uniformità e rilevamento delle varianti, sia con i kit di preparazione della libreria KAPA™ che Qiagen®. Per le nuove regioni che hanno come target il gene APC, la combinazione dello strumento Illumina MiSeq®, del test SOPHiA DDM™ Dx HCS e di SOPHiA DDM™ porta a una performance osservata del 100% di sensibilità, 100% di specificità, 100% di accuratezza, 100% di precisione. La riproducibilità complessiva con i kit di preparazione delle librerie KAPA™ o Qiagen® è stata superiore al 99,9%.



8. SIMBOLI

Simbolo	Titolo
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Numero di catalogo
	Codice lotto (numero di lotto)
	Attenzione
	Produttore
	Limite di temperatura
	Data di scadenza
	Conformità europea
	Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
	Dispositivo medico per diagnostica in vitro
	Contiene un numero sufficiente per <n> test
	Importatore
	Data di produzione
	Consultare il paragrafo Avvertenze e precauzioni nella “Sezione 5. Materiali e metodi del kit”
	Consultare il paragrafo Avvertenze e precauzioni nella “Sezione 5. Materiali e metodi del kit”



9. SUPPORTO

In caso di difficoltà nell'utilizzo della modalità SOPHiA DDM™ Dx, consultare la sezione di risoluzione dei problemi del Manuale d'uso della modalità SOPHiA DDM™ Dx disponibile su SOPHiA DDM™ Dx o contattare la nostra linea di assistenza al numero di telefono +41 21 694 10 60 o all'indirizzo e-mail support@sophiagenetics.com. Visitare il sito www.sophiagenetics.com per maggiori dettagli. È possibile richiedere assistenza anche tramite web dalla schermata Dashboard nella sezione Supporto della modalità SOPHiA DDM™ Dx.



APPENDICE 1. PIASTRE ADATTATRICI A DOPPIO INDICE

32 adattatori a doppio indice compatibili con Illumina® in formato piastra da 96 pozzetti (7 µl ciascuno)

	1	2	3	4	5	6	7	...	12
A	701-501	701-502	701-503	701-504					
B	702-501	702-502	702-503	702-504					
C	703-501	703-502	703-503	703-504					
D	704-501	704-502	704-503	704-504					
E	705-501	705-502	705-503	705-504					
F	706-501	706-502	706-503	706-504					
G	707-501	707-502	707-503	707-504					
H	708-501	708-502	708-503	708-504					



48 adattatori a doppio indice compatibili con Illumina® in formato piastra da 96 pozzetti (7 µl ciascuno)

	1	2	3	4	5	6	7	...	12
A	701-501	703-502	705-503	707-501	709-502	711-503			
B	702-501	704-502	706-503	708-501	710-502	712-503			
C	703-501	705-502	701-504	709-501	711-502	707-504			
D	704-501	706-502	702-504	710-501	712-502	708-504			
E	705-501	701-503	703-504	711-501	707-503	709-504			
F	706-501	702-503	704-504	712-501	708-503	710-504			
G	701-502	703-503	705-504	707-502	709-503	711-504			
H	702-502	704-503	706-504	708-502	710-503	712-504			

96 adattatori a doppio indice compatibili con Illumina® in formato piastra da 96 pozzetti (7 µl ciascuno)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	701-501	702-501	703-501	704-501	705-501	706-501	707-501	708-501	709-501	710-501	711-501	712-501
B	701-502	702-502	703-502	704-502	705-502	706-502	707-502	708-502	709-502	710-502	711-502	712-502
C	701-503	702-503	703-503	704-503	705-503	706-503	707-503	708-503	709-503	710-503	711-503	712-503
D	701-504	702-504	703-504	704-504	705-504	706-504	707-504	708-504	709-504	710-504	711-504	712-504
E	701-505	702-505	703-505	704-505	705-505	706-505	707-505	708-505	709-505	710-505	711-505	712-505
F	701-506	702-506	703-506	704-506	705-506	706-506	707-506	708-506	709-506	710-506	711-506	712-506
G	701-507	702-507	703-507	704-507	705-507	706-507	707-507	708-507	709-507	710-507	711-507	712-507
H	701-508	702-508	703-508	704-508	705-508	706-508	707-508	708-508	709-508	710-508	711-508	712-508



i5	Sequenze i5 per foglio campione
D501	TATAGCCT
D502	ATAGAGGC
D503	CCTATCCT
D504	GGCTCTGA
D505	AGGCGAAG
D506	TAATCTTA
D507	CAGGACGT
D508	GTACTGAC

i7	Sequenze i7 per foglio campione
D701	ATTACTCG
D702	TCCGGAGA
D703	CGCTCATT
D704	GAGATTCC
D705	ATTCAGAA
D706	GAATTCGT
D707	CTGAAGCT
D708	TAATGCGC
D709	CGGCTATG
D710	TCCGCGAA
D711	TCTCGCGC
D712	AGCGATAG



APPENDICE 2. ATTREZZATURA DI LABORATORIO USATA NEL LABORATORIO DI SOPHIA GENETICS

MATERIALI FORNITI DALL'UTENTE	FORNITORE	NOME PRODOTTO	N° di CATALOGO
Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi (0,2 ml)	Thermo Fisher Scientific	Provette a scatto EasyStrip	AB-2000
Provette a basso legame con il DNA (1,5 ml)	Axygen	Provette per microcentrifughe MaxyClear	MCT-175-C
Provette (1,5 ml)	Eppendorf	Provette Eppendorf	3810X
Provette coniche (15 ml e 50 ml)	Falcon	Provette coniche per centrifuga da 15 ml e 50 ml	352096 & 352070
Punte filtro	Starlab	TipOne RPT	S1180-3710, S1183- 1740, S1180-8710, S1180-9710, S1182- 1730
Etanolo (grado biologia molecolare)	Merck	Etanolo assoluto	1.00983.1000

ZONA PRE-PCR	FORNITORE	NOME PRODOTTO	N° di CATALOGO
Miscelatore a vortice	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Microcentrifuga da banco (compatibile con strisce da 8 provette)	Starlab	Mini centrifuga	N2631-0007
Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti	Alpaqua	96S Super Magnet Plate	A001322
Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti	Thermo Fisher Scientific	DynaMag-96 Side Magnet (DynaMag-96 magnete laterale)	12331D
Pipette multicanale (P10; P100; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108- 1100, S7108-3300
Termociclatore con coperchio riscaldato programmabile	Biometra	TAdvanced 96	
Attrezzatura e reagente per la quantificazione fluorometrica	Thermo Fisher Scientific	Qubit 3.0 Fluorometer (fluorometro) & Qubit dsDNA HS Assay kit (kit di test)	Q33216 & Q32854

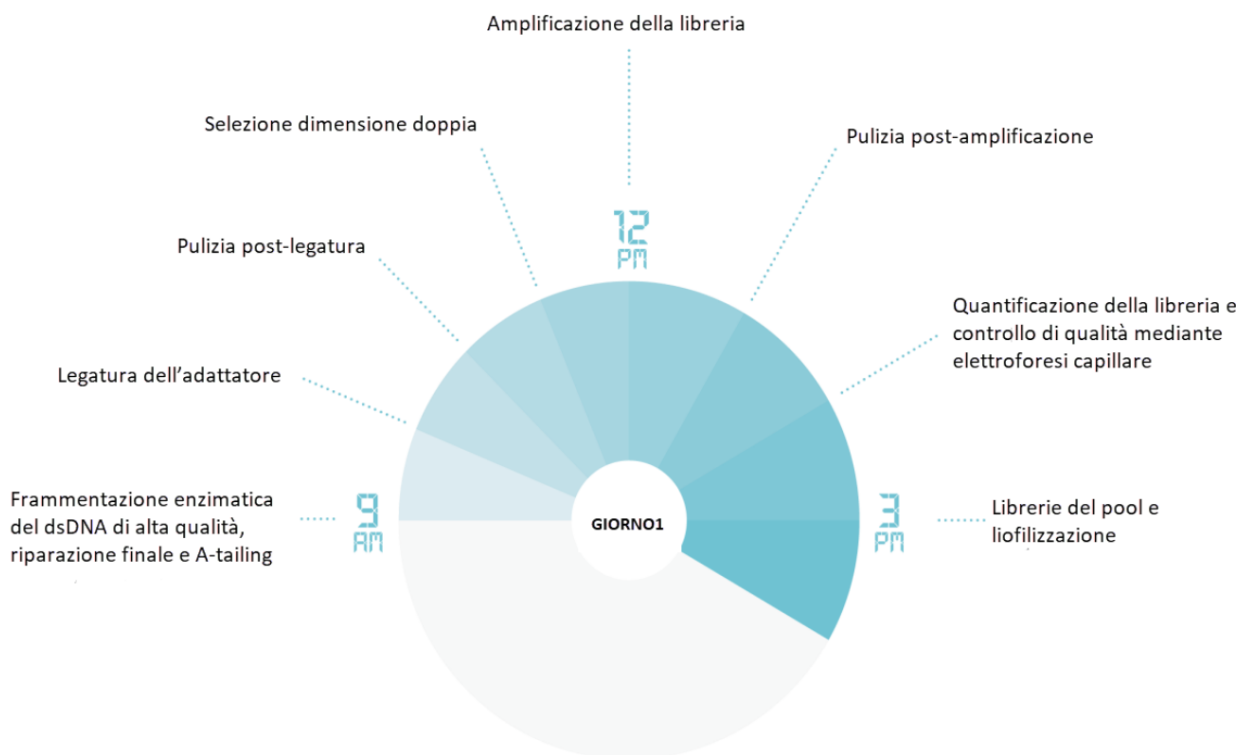


ZONA PRE-PCR	FORNITORE	NOME PRODOTTO	N° di CATALOGO
Pipette monocanale (P10; P100; P200; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100- 1100, S7100-2200, S7100-1000

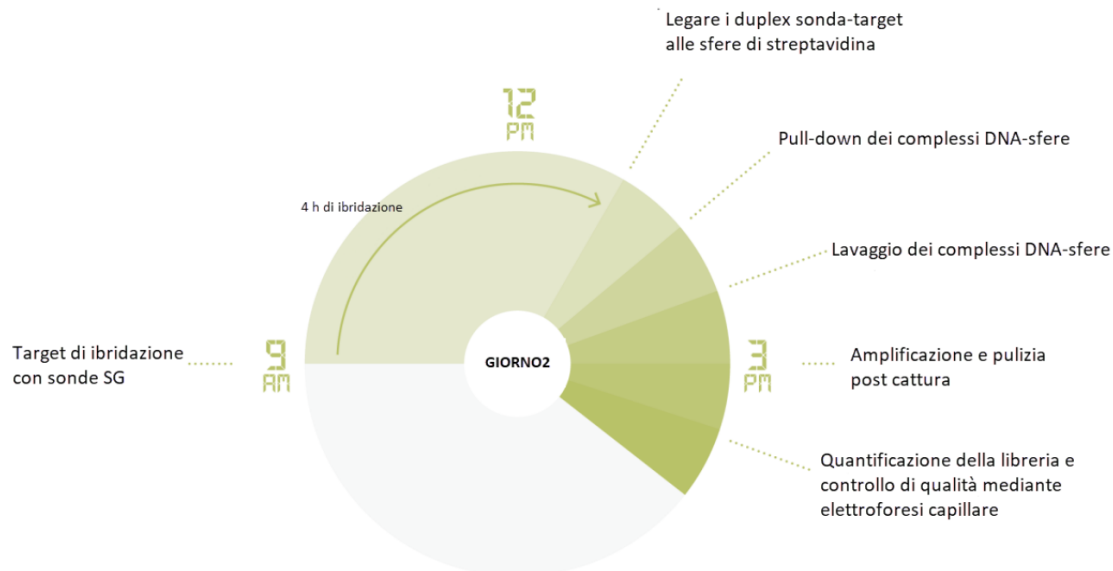
ZONA POST-PCR	FORNITORE	NOME PRODOTTO	N° di CATALOGO
Termociclatore con coperchio riscaldato programmabile	Biometra	TAdvanced 96	
Sistema di elettroforesi capillare	Advanced Analytical	Agilent Fragment Analyzer (Agilent analizzatore frammenti)	
Concentratore di vuoto (SpeedVac™ o simile)	Thermo Fisher Scientific	Savant DNA120-230	
Riscaldatore a blocco secco o bagnomaria (compatibile con provette da 1,5 ml)	Techne	Dri-Block DB-1	
Rack a separazione magnetica (compatibile con provette da 1,5 ml)	Thermo Fisher Scientific	MagJET Separation Rack (MagJET rack di separazione), 12 provette da 1,5 ml	MR02
Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti	Alpaqua	96S Super Magnet Plate	A001322
Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti	Thermo Fisher Scientific	DynaMag-96 Side Magnet (DynaMag-96 magnete laterale)	12331D
Miscelatore a vortice	Grant instrument	Miscelatore a vortice multi-provetta, V32	
Miscelatore a vortice	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Microcentrifuga da banco (compatibile con strisce da 8 provette)	StarLab	Mini centrifuga	N2631-0007
Pipette multicanale (P10; P100; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108- 1100, S7108-3300
Attrezzatura e reagente per la quantificazione fluorometrica	Thermo Fisher Scientific	Qubit 3.0 Fluorometer (fluorometro) & Qubit dsDNA HS Assay kit (kit di test)	Q33216 & Q32854
Pipette monocanale (P10; P100; P200; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100- 1100, S7100-2200, S7100-1000



APPENDICE 3. FLUSSO DI LAVORO GENERALE – SOPHiA DDM™ CAPTURE SOLUTIONS



Preparazione libreria Con SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I



CATTURA

FLUSSO DI LAVORO FACILE

- SOLO 1-4 PROVETTE DA GESTIRE (LIBRERIE IN POOL MULTIPLEX)
- SOLO 3 ORE DI LAVORO



APPENDICE 4. ELENCO DELLE REGIONI TARGET, REGIONI PROBLEMATICHE APPLICABILI E CONTRASSEGNALE

REGIONI TARGET*

Regioni target		
CROMOSOMA	INIZIO	FINE
1	45794953	45795134
1	45796163	45796254
1	45796829	45797031
1	45797067	45797253
1	45797308	45797546
1	45797670	45797783
1	45797813	45798007
1	45798038	45798185
1	45798221	45798384
1	45798410	45798531
1	45798565	45798656
1	45798744	45798867
1	45798932	45799021
1	45799060	45799300
1	45800038	45800208
1	45805866	45805951
2	47596620	47596745
2	47600577	47600734
2	47600922	47601212
2	47602348	47602463
2	47604128	47604241
2	47606067	47606218
2	47606883	47607069
2	47612280	47612374



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
2	47613686	47613777
2	47630306	47630566
2	47635515	47635719
2	47637208	47637536
2	47639528	47639724
2	47641383	47641582
2	47643410	47643593
2	47656871	47657105
2	47672662	47672821
2	47690145	47690318
2	47693772	47693972
2	47698079	47698226
2	47702139	47702434
2	47703481	47703735
2	47705386	47705683
2	47707810	47708035
2	47709893	47710113
2	48010348	48010657
2	48018041	48018287
2	48023008	48023227
2	48025725	48028319
2	48030534	48030849
2	48032024	48032191
2	48032732	48032871
2	48033318	48033522
2	48033566	48033815
2	48033893	48034024
2	215593375	215593757
2	215595110	215595257
2	215609766	215609908
2	215610421	215610603
2	215617146	215617304



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
2	215632181	215632403
2	215633931	215634061
2	215645259	215646258
2	215656996	215657194
2	215661760	215661866
2	215674111	215674318
3	37035014	37035179
3	37038085	37038225
3	37042421	37042569
3	37045867	37045990
3	37048457	37048579
3	37050280	37050421
3	37053286	37053378
3	37053477	37053615
3	37055898	37056060
3	37058972	37059115
3	37061776	37061979
3	37067103	37067523
3	37070250	37070448
3	37081652	37081810
3	37083734	37083847
3	37088985	37089199
3	37089983	37090125
3	37090370	37090533
3	37091952	37092169
3	178916589	178916990
3	178917453	178917712
3	178919053	178919353
3	178921307	178921602
3	178922266	178922401
3	178927358	178927513
3	178927949	178928151



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
3	178928194	178928378
3	178935973	178936147
3	178936959	178937090
3	178937334	178937548
3	178937712	178937865
3	178938749	178938970
3	178941844	178942000
3	178942463	178942634
3	178943725	178943853
3	178947035	178947255
3	178947767	178947934
3	178947988	178948189
3	178951857	178952177
4	84383597	84384080
4	84384622	84384786
4	84388582	84388716
4	84390160	84390329
4	84391331	84391574
4	84393350	84393466
4	84397771	84397857
4	84403282	84403422
4	84406114	84406250
5	112043390	112043604
5	112090563	112090747
5	112101998	112102132
5	112102861	112103112
5	112111301	112111459
5	112116462	112116625
5	112128118	112128251
5	112136951	112137105
5	112151167	112151315
5	112154638	112155066



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
5	112157568	112157713
5	112162780	112162969
5	112163601	112163728
5	112164528	112164694
5	112170623	112170887
5	112173225	112179848
5	131892992	131893170
5	131894951	131895084
5	131911444	131911645
5	131914984	131915219
5	131915529	131915783
5	131923229	131923407
5	131923591	131923806
5	131924354	131924597
5	131925298	131925554
5	131926891	131927123
5	131927544	131927751
5	131930536	131930761
5	131931240	131931527
5	131938967	131939206
5	131939587	131939763
5	131940473	131940716
5	131944282	131944442
5	131944784	131944926
5	131944950	131945113
5	131951670	131951751
5	131951754	131951847
5	131953737	131954011
5	131972782	131972917
5	131973748	131973940
5	131976339	131976522
5	131977845	131978081



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
7	6013005	6013198
7	6017194	6017413
7	6018202	6018352
7	6022430	6022647
7	6026365	6027276
7	6029406	6029611
7	6031579	6031713
7	6035140	6035289
7	6036932	6037079
7	6038714	6038931
7	6042059	6042292
7	6043296	6043448
7	6043578	6043714
7	6045498	6045687
7	6048603	6048675
7	6776682	6777592
7	6781291	6781508
7	6785694	6785844
7	6786642	6786861
7	6790855	6791257
7	152345702	152346473
7	152357761	152357892
7	152373101	152373189
8	90947785	90947865
8	90949229	90949328
8	90955456	90955619
8	90958343	90958548
8	90960027	90960145
8	90965447	90965944
8	90967486	90967808
8	90970928	90971107
8	90976613	90976760



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
8	90982567	90982810
8	90983376	90983543
8	90990423	90990576
8	90992937	90993146
8	90993578	90993776
8	90994925	90995108
8	90996728	90996814
10	89624202	89624330
10	89653757	89653891
10	89685245	89685339
10	89690778	89690871
10	89692745	89693033
10	89711850	89712041
10	89717585	89717801
10	89720626	89720900
10	89725019	89725254
11	94153266	94153372
11	94163052	94163177
11	94168973	94169090
11	94170318	94170426
11	94178951	94179084
11	94180360	94180629
11	94189417	94189529
11	94192549	94192772
11	94194077	94194227
11	94197254	94197430
11	94200954	94201084
11	94203612	94203833
11	94204715	94204950
11	94209430	94209594
11	94211876	94212067
11	94212815	94212952



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
11	94219065	94219275
11	94223974	94224156
11	94225923	94225992
11	108098327	108098448
11	108098478	108098640
11	108099880	108100075
11	108106372	108106586
11	108114655	108114870
11	108115490	108115778
11	108117666	108117879
11	108119635	108119854
11	108121403	108121824
11	108122539	108122783
11	108123519	108123664
11	108124516	108124791
11	108126917	108127092
11	108128183	108128358
11	108129688	108129827
11	108137873	108138094
11	108139112	108139361
11	108141766	108141898
11	108141953	108142158
11	108143234	108143359
11	108143424	108143604
11	108150193	108150360
11	108151697	108151920
11	108153412	108153631
11	108154929	108155225
11	108158302	108158467
11	108159679	108159855
11	108160304	108160553
11	108163321	108163545



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
11	108164015	108164229
11	108165629	108165811
11	108167989	108168134
11	108170416	108170637
11	108172350	108172541
11	108173555	108173781
11	108175377	108175604
11	108178599	108178736
11	108180862	108181067
11	108183113	108183250
11	108186525	108186663
11	108186713	108186865
11	108188075	108188273
11	108190656	108190810
11	108192003	108192172
11	108196012	108196296
11	108196760	108196977
11	108198347	108198510
11	108199723	108199990
11	108200916	108201173
11	108202146	108202309
11	108202581	108202789
11	108203464	108203652
11	108204588	108204720
11	108205671	108205861
11	108206547	108206713
11	108213924	108214123
11	108216445	108216660
11	108217981	108218117
11	108224468	108224632
11	108225513	108225626
11	108235784	108235970



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
11	108236027	108236260
13	32890573	32890689
13	32893189	32893487
13	32899188	32899346
13	32900213	32900312
13	32900354	32900444
13	32900611	32900775
13	32903555	32903654
13	32905031	32905192
13	32906384	32907549
13	32910377	32915358
13	32918670	32918815
13	32920939	32921058
13	32928973	32929450
13	32930540	32930771
13	32931854	32932091
13	32936635	32936855
13	32937291	32937695
13	32944514	32944719
13	32945068	32945262
13	32950782	32950953
13	32953429	32953677
13	32953862	32954075
13	32954119	32954307
13	32968801	32969095
13	32971010	32971206
13	32972274	32972932
16	23614755	23615015
16	23619160	23619358
16	23625300	23625437
16	23632667	23632824
16	23634265	23634476



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
16	23635305	23635440
16	23637532	23637743
16	23640500	23640621
16	23640936	23641815
16	23646158	23647680
16	23649146	23649298
16	23649366	23649475
16	23652406	23652503
16	68771294	68771391
16	68772175	68772339
16	68835548	68835821
16	68842302	68842495
16	68842571	68842776
16	68844075	68844269
16	68845562	68845787
16	68846013	68846191
16	68847191	68847423
16	68849393	68849687
16	68853158	68853353
16	68855879	68856153
16	68857277	68857554
16	68862052	68862232
16	68863532	68863725
16	68867168	68867427
17	7572902	7573033
17	7573902	7574058
17	7576568	7576682
17	7576828	7576951
17	7576994	7577180
17	7577474	7577633
17	7578152	7578314
17	7578346	7578579



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
17	7579287	7579615
17	7579675	7579746
17	7579814	7579937
17	33427947	33428080
17	33428195	33428409
17	33430248	33430368
17	33430448	33430588
17	33433380	33433525
17	33433982	33434166
17	33434360	33434491
17	33443909	33444081
17	33445495	33445663
17	33446105	33446216
17	33446526	33446657
17	41197670	41197844
17	41199635	41199745
17	41201113	41201236
17	41203055	41203159
17	41209044	41209177
17	41215325	41215415
17	41215866	41215993
17	41219600	41219737
17	41222920	41223280
17	41226323	41226563
17	41228480	41228656
17	41231326	41231441
17	41234396	41234617
17	41242936	41243074
17	41243427	41246902
17	41247838	41247964
17	41249236	41249331
17	41251767	41251922



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
17	41256114	41256303
17	41256860	41256998
17	41258448	41258575
17	41267718	41267821
17	41276009	41276138
17	56769980	56770174
17	56772267	56772579
17	56774029	56774245
17	56780532	56780715
17	56787195	56787376
17	56798082	56798198
17	56801376	56801486
17	56809820	56809930
17	56811454	56811608
17	59760632	59761526
17	59763172	59763551
17	59770766	59770898
17	59793287	59793449
17	59820349	59820520
17	59821768	59821977
17	59853737	59853948
17	59857597	59857787
17	59858176	59858391
17	59861606	59861810
17	59870933	59871115
17	59876436	59876685
17	59878589	59878860
17	59885803	59886143
17	59924437	59924606
17	59926465	59926642
17	59934394	59934617
17	59937132	59937293



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
17	59938783	59938925
19	1206888	1207227
19	1218391	1218524
19	1219298	1219431
19	1220347	1220529
19	1220555	1220741
19	1221187	1221364
19	1221923	1222030
19	1222959	1223196
19	1226428	1226671
22	29083860	29083999
22	29085098	29085228
22	29089995	29090130
22	29091090	29091255
22	29091673	29091886
22	29092864	29093000
22	29095801	29095950
22	29099468	29099579
22	29105969	29106072
22	29107872	29108030
22	29115358	29115498
22	29120940	29121137
22	29121206	29121380
22	29130366	29130734

*Una regione target è la posizione in cui la pipeline riporterà le varianti ad alta attendibilità quando sono presenti. Le coordinate sono basate su 1 e la coordinata finale è inclusa nella regione.



REGIONI PROBLEMATICHE APPLICABILI**

CROMOSOMA	INIZIO	FINE
chr2	48018282	48018315
chr3	37067075	37067120
chr5	112111309	112111311
chr11	94152620	94152662
chr17	59757835	59757859

**Una regione problematica è una regione intronica all'interno del target che potrebbe causare incertezze nella chiamata delle varianti. Potrebbe essere correlata dalla tecnologia di sequenziamento. Una variante rilevata in questa regione verrà designata come "bassa" nella tabella di attendibilità in SOPHiA DDM™. La colonna del filtro della variante corrispondente nella tabella finale della variante completa verrà contrassegnata come "regioni problematiche". Le coordinate sono basate su 1 e la coordinata finale è inclusa nella regione.

REGIONI CONTRASSEGNALE APPLICABILI***

Regioni contrassegnate applicabili

CROMOSOMA	INIZIO	FINE	DESCRIZIONE
2	47635515	47635560	le varianti in questa regione possono essere confuse da artefatti di sequenziamento
2	48032732	48032820	le varianti in questa regione possono essere confuse da artefatti di sequenziamento
3	37067103	37067240	le varianti in questa regione possono essere confuse da artefatti di sequenziamento
7	6036932	6037079	le varianti in questa regione possono essere confuse da artefatti di sequenziamento
3	178937334	178937548	la regione è molto simile a un'altra regione genomica (la regione con la massima somiglianza è chr22:17053913- 17054324, hg19/GRCh37) - le varianti devono essere interpretate con attenzione
3	178937712	178937865	la regione è molto simile a un'altra regione genomica (la regione con la massima somiglianza è chr22:17054288- 17054442, hg19/GRCh37) - le varianti devono essere interpretate con attenzione
7	6012845	6013198	la regione è molto simile a un'altra regione genomica (la regione con la massima somiglianza è nello pseudogene PMS2CL,



CROMOSOMA	INIZIO	FINE	DESCRIZIONE
			chr7:6790854-6791209, hg19/GRCh37) - le varianti devono essere interpretate con attenzione
7	6017194	6017413	la regione è molto simile a un'altra regione genomica (la regione con la massima somiglianza è nello pseudogene PMS2CL, chr7:6786641-6786861, hg19/GRCh37) - le varianti devono essere interpretate con attenzione
7	6018202	6018352	la regione è molto simile a un'altra regione genomica (la regione con la massima somiglianza è nello pseudogene PMS2CL, chr7:6785693-6785844, hg19/GRCh37) - le varianti devono essere interpretate con attenzione
7	6022430	6022647	la regione è molto simile a un'altra regione genomica (la regione con la massima somiglianza è nello pseudogene PMS2CL, chr7:6781290-6781508, hg19/GRCh37) - le varianti devono essere interpretate con attenzione
7	6026365	6027276	la regione è molto simile a un'altra regione genomica (la regione con la massima somiglianza è nello pseudogene PMS2CL, chr7:6776681-6777592, hg19/GRCh37) - le varianti devono essere interpretate con attenzione
7	6776682	6777592	la regione è molto simile a un'altra regione genomica (la regione con la massima somiglianza è nel gene PMS2, chr7:6026364-6027276, hg19/GRCh37) - le varianti devono essere interpretate con attenzione
7	6781291	6781508	la regione è molto simile a un'altra regione genomica (la regione con la massima somiglianza è nel gene PMS2, chr7:6022429-6022647, hg19/GRCh37) - le varianti devono essere interpretate con attenzione
7	6785694	6785844	la regione è molto simile a un'altra regione genomica (la regione con la massima somiglianza è nel gene PMS2, chr7:6018201-6018352, hg19/GRCh37) - le varianti devono essere interpretate con attenzione
7	6786642	6786861	la regione è molto simile a un'altra regione genomica (la regione con la massima somiglianza è nel gene PMS2, chr7:6017193-6017413, hg19/GRCh37) - le varianti devono essere interpretate con attenzione
7	6790855	6791257	la regione è molto simile a un'altra regione genomica (la regione con la massima somiglianza è nel gene PMS2, chr7:6012796-6013198, hg19/GRCh37) - le varianti devono essere interpretate con attenzione
22	29085098	29085228	la regione è molto simile a un'altra regione genomica (la regione con maggiore somiglianza è chr16:33366704-33366835, hg19/GRCh37) - le varianti devono essere interpretate con attenzione



***Una regione contrassegnata è una regione che si sovrappone a un esone e potrebbe causare incertezze nella chiamata delle varianti, ad esempio per i seguenti motivi: bassa complessità, rumorosa, pseudogena, ecc. Potrebbe dipendere dalla tecnologia di sequenziamento. Una variante rilevata in questa regione non verrà classificata con bassa attendibilità in SOPHiA DDM™, ma le verrà associato un triangolo di avvertenza e verrà reso disponibile un messaggio di avvertenza dettagliato corrispondente nella scheda delle avvertenze. La colonna del filtro della variante corrispondente nella tabella finale della variante completa non verrà contrassegnata a causa di questa regione. Le coordinate sono basate su 1 e la coordinata finale è inclusa nella regione.



Document Approvals
Approved Date: 28 Jan 2026

Approval Verdict: Approve	Coleman Spence, (cspence@sophiagenetics.com) Regulatory Approval 28-Jan-2026 01:05:40 GMT+0000
QA Approval Verdict: Approve	Claire Mullane, (cmullane@sophiagenetics.com) Quality Assurance Approval 28-Jan-2026 09:02:34 GMT+0000