

ISTRUZIONI PER L'USO

32 CAMPIONI

SOPHiA DDM™ Dx RNAtarget Oncology Solution



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





SINTESI DELLE INFORMAZIONI

Nome prodotto	SOPHiA DDM™ Dx RNAtarget Oncology Solution
Tipo di prodotto	Soluzione bundle
Famiglia di prodotti	Kit molecolare + analisi
ID algoritmo	ILL1XGR1S2_FFPE_NextSeq
Sequenziatore	Illumina® - NextSeq® 550
ID pannello geni	ROS_v1
Versione del prodotto	v1.0
Tipo di campione	RNA isolato da campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE).
Versione di lancio	1.0.0
ID documento	SG-00700
Versione del documento	v4.0
Data di revisione	Gennaio 2026

Queste istruzioni per l'uso (IFU) sono applicabili a tutte le versioni di SOPHiA DDM™.

Si prega di leggere attentamente le IFU prima di utilizzare questo prodotto.



SOPHiA GENETICS SA
ZA La Pièce 12
1180 Rolle
Switzerland



BS0119ILLCSRY07-32



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	BS0119ILLCSRY07-32	B1.L1.0019.C-32	B2.0019.C-48	6C0233



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 NextSeq® 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.

Agilent Fragment Analyzer™ è un marchio di Agilent Technologies, Inc.

SOPHiA GENETICS™ e SOPHiA DDM™ sono marchi commerciali 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-00700 (v4.0)	Gennaio 2026	SG-00662 (v8.0)	• Modifica al sistema di numerazione delle versioni, nessuna versione aggiuntiva tra la versione 2.2 e la versione 4.0. • 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: Rimozione della descrizione dei componenti del CDS • Sezione 3: Rimozione della descrizione dei componenti del CDS • Rimozione dell'Allegato che fa riferimento a Descrizione dell'analisi e parametri CDS • Sezione 9.0: rimozione delle avvertenze e delle limitazioni e precauzioni che non rientrano nell'ambito del prodotto IVD • Figura 1: Revisione del nome della piattaforma e dell'ambito IVD • Avvertenze e Precauzioni: Aggiunta del numero di identificazione CAS e della concentrazione per ogni componente pericoloso identificato • Sezione 9.3 fusa con Sezione 9.3.1 come Limitazioni generali • Riduzione del volume del contenuto delle sonde di ibridazione SOPHiA GENETICS da 20uL a 18uL (vedere Sezione 5.1.1 Contenuto del kit - BOX 1) • Rimozione della proprietà intellettuale del fornitore di terze parti dalle sezioni: 5.1.1 Contenuto del kit, 5.4.1 Pooling della libreria per ibridazione e cattura, 5.4.2 Ibridazione • Modifica di "App Web SOPHiA DDM™" in "Modalità SOPHiA DDM™ Dx" • SOPHiA GENETICS™ cambiato in SOPHiA GENETICS • Inserito il simbolo ™ in tutto il documento, ove applicabile • Modifica del nome del kit di preparazione delle librerie in SOPHiA GENETICS™ RNA Library Prep Kit • Riformulazioni minori relative alle modifiche terminologiche sopra indicate • Sezioni 2, 3, 4, 5.1.1, 5.2.6, 5.2.8, 5.2.9, 5.2.10, 6.1, 6.3, 7.1, 9.1 e 12: armonizzazione del testo • Sezione 5.2.2: Corretta l'unità di volume nella tabella Pre-mix RT
SG-00700 (v2.2)	Settembre 2025		• Aggiornamento dell'indirizzo REP della CE
SG-00700 (v2.1)	Marzo 2025		• Sezione 5.1.1 Contenuto del kit - BOX 1: aumento del volume del tampone di ibridazione 2x da 50 µl a 75 µl; aumento del volume del Potenziatore per tamponi di ibridazione da 20 µl a 30 µl.
SG-00700 (v2.0)	Maggio 2022		• Modifica del nome del kit di Preparazione della libreria • Modifica della formulazione delle avvertenze (Sezione 9)



ID DOCUMENTO /VERSIONE	DATA	Versione equivalente delle istruzioni per l'uso in inglese	DESCRIZIONE DELLA MODIFICA
SG-00700 (v1.0)	Maggio 2022		• Release iniziale



SOMMARIO

1. Finalità previste	9
2. Dichiarazione generale dei principi e della procedura del test.....	10
3. Componenti del prodotto	11
4. Modalità SOPHiA DDM™ Dx.....	12
5. Materiali e metodi del kit.....	13
5.1. Considerazioni iniziali	13
5.1.1. <i>Contenuto del kit (32 campioni)</i>	13
5.1.2. <i>Materiale richiesto (non fornito)</i>	17
5.2. Preparazione libreria	19
5.2.1. <i>Preparazione RNA totale</i>	19
5.2.2. <i>Preparazione dei pre-mix e dei reagenti</i>	21
5.2.3. <i>Retrotrascrizione (RT) - RNA FFPE</i>	23
5.2.4. <i>Sintesi del secondo filamento di cDNA</i>	24
5.2.5. <i>Pulizia del cDNA</i>	25
5.2.6. <i>Riparazione finale e A-tailing</i>	26
5.2.7. <i>Legatura</i>	27
5.2.8. <i>Pulizia post-legatura</i>	28
5.2.9. <i>Amplificazione della libreria</i>	29
5.2.10. <i>Pulizia post-amplificazione</i>	30
5.3. Quantificazione individuale della libreria e controllo qualità	31
5.4. Cattura	32
5.4.1. <i>Pooling della libreria per ibridazione e cattura</i>	32
5.4.2. <i>Ibridazione</i>	33
5.4.3. <i>Preparazione delle sfere di streptavidina</i>	35
5.4.4. <i>Legame di target ibridati alle sfere</i>	36
5.4.5. <i>Lavare le sfere di streptavidina per rimuovere il DNA non legato</i>	37
5.5. Amplificazione post-cattura	38
5.6. Pulizia post-cattura dell'amplificazione.....	40
5.7. Quantificazione finale della libreria e controllo qualità	41
5.8. Preparazione della libreria per il sequenziamento	41
6. Procedura di analisi	43
6.1. Demultiplexing dei dati NGS	43
6.2. Caricamento e analisi dei dati	43
6.3. Generazione di report.....	43
7. Descrizione dell'analisi e parametri	46
7.1. File delle risorse	46
7.2. Geni target.....	46
7.3. Pre-elaborazione dei dati grezzi	47
7.3.1. <i>Pre-elaborazione</i>	47
7.3.2. <i>Allineamento</i>	47



7.4. Elenco dei moduli inclusi.....	47
7.4.1. Modulo di chiamata di eventi di fusione genica/exon skipping:	47
7.4.2. Indicatore di qualità.....	49
8. Valutazione delle prestazioni	50
8.1. Valutazione delle prestazioni analitiche	50
8.1.1. Stato di fusione/exon skipping Concordanza con il campione NGS di confronto	50
8.1.2. Limite di rilevamento fusioni/exon skipping	50
8.1.3. Ripetibilità dello stato di fusione/exon skipping	51
8.2. Valutazione delle prestazioni cliniche	51
9. Avvertenze, precauzioni e limitazioni	52
9.1. AVVERTENZE GENERALI.....	52
9.2. Precauzioni generali	52
9.3. LIMITAZIONI GENERALI	53
10. Riferimenti	64
11. Simboli	65
12. Supporto	66
13 Risoluzione dei problemi	67
14. APPENDICE II-Piastre primer per doppio indice univoco.....	68



1. FINALITÀ PREVISTE

SOPHiA DDM™ Dx RNAtarget Oncology Solution (ROS, "il Prodotto") è destinato ad essere utilizzato per identificare fusioni geniche clinicamente rilevanti che coinvolgono i geni *ALK*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FGFR4*, *NRG1*, *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *RET* e *ROS1*, ed eventi di exon skipping in *EGFR* e *MET* nell'RNA estratto da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) di pazienti con diagnosi di cancro al polmone, mirando a trascritti specifici. La funzione del prodotto è quella di fornire un aiuto agli operatori sanitari per prendere decisioni cliniche relative a eventi di fusione genica/exon skipping e di fornire un riscontro molecolare per l'appropriata strategia di gestione della malattia. Il prodotto è un dispositivo semiautomatico e qualitativo destinato a essere utilizzato come diagnostica in vitro solo per uso professionale.



2. DICHIARAZIONE GENERALE DEI PRINCIPI E DELLA PROCEDURA DEL TEST

I geni di fusione sono importanti biomarcatori clinici in oncologia che guidano la diagnosi, informano sulla prognosi e supportano le decisioni terapeutiche¹. Ad esempio, fino al 17% dei tumori solidi è caratterizzato da fusioni geniche. Le fusioni geniche sono tra i target di maggior successo della medicina oncologica di precisione, con molti farmaci che hanno come target le proteine di fusione nell'uso clinico di routine. Il modo più completo per rilevare le fusioni è l'uso di saggi di sequenziamento di nuova generazione (NGS) basati sull'RNA, che possono rilevare eventi di fusione nuovi e noti.

SOPHiA DDM™ Dx RNAtarget Oncology Solution (ROS) è un test basato su NGS sviluppato da SOPHiA GENETICS, destinato all'individuazione qualitativa, all'annotazione e alla preclassificazione di fusioni geniche o eventi di exon skipping e incorpora un pannello multi-gene adatto a diversi tipi di tumore solido. Il prodotto è destinato all'elaborazione e all'analisi di campioni di RNA estratti da biopsie FFPE di pazienti o da campioni di tessuto di cancro del polmone sottoposti a resezione chirurgica. Il kit e il protocollo NGS sono stati progettati per consentire agli utenti di elaborare 10 ng - 200 ng (consigliati 50 ng) di RNA per la costruzione di librerie NGS, l'arricchimento della cattura basata sull'ibridazione di 13 geni (come definito nello scopo previsto) e il sequenziamento mediante la piattaforma Illumina® NextSeq® 550.

La modalità sicura SOPHiA DDM™ Dx basata sul cloud, che ospita una pipeline bioinformatica personalizzata, consente agli utenti di caricare i dati NGS e di ottenere un rapporto sulla soluzione ROS di SOPHiA DDM™ Dx in formato PDF. Il rapporto descrive gli eventi di fusione e di exon skipping rilevati in un campione, il punteggio e lo stato di qualità del campione. Solo gli eventi di fusione coinvolti negli 11 geni target e gli eventi di exon skipping (MET ex14, EGFRvIII) nei 2 geni target definiti nello scopo prefissato saranno riportati nel report IVD con l'elenco dei trascritti riportato nella Tabella 1.

Tabella 1. Elenco dei trascrittori coinvolti nelle fusioni clinicamente rilevanti nei rapporti IVD

Gene	RefSeq ID	Gene	RefSeq ID
ALK	NM_004304	NRG1	NM_013964
EGFR	NM_005228	NTRK1	NM_002529
FGFR1	NM_023110	NTRK2	NM_006180
FGFR2	NM_000141	NTRK3	NM_001012338
FGFR3	NM_000142	RET	NM_020975
FGFR4	NM_213647	ROS1	NM_002944
MET	NM_000245		

Questa tabella si basa sui database COSMIC² o ChimerDB³, la cui annotazione è fornita nella relazione. Per qualsiasi fusione che coinvolga un trascritto al di fuori di questo elenco verranno fornite solo le coordinate genomiche.

È bene notare che i risultati di un'analisi genetica devono essere interpretati solo da un esperto qualificato in genetica molecolare, come un genetista di laboratorio clinico registrato a livello europeo (ErCLG) e certificato dall'European Board of Medical Genetics (EBMG).

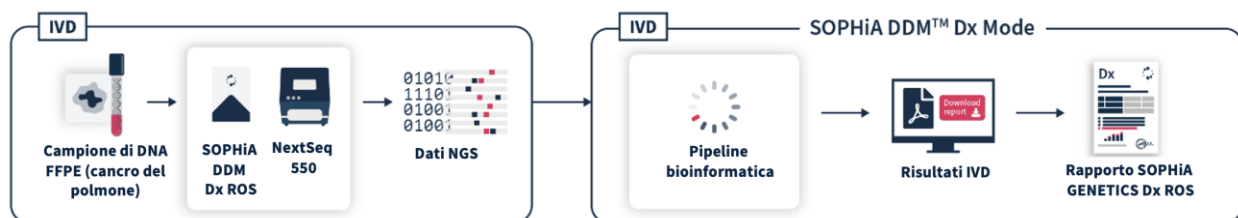


3. COMPONENTI DEL PRODOTTO

SOPHiA DDM™ Dx ROS è una soluzione completa che unisce il kit di caratterizzazione del target con la potenza analitica dell'IA e viene utilizzata in combinazione con un accessorio IVD, la modalità SOPHiA DDM™ Dx basata sul cloud. Il prodotto è costituito da due componenti: Il kit di preparazione e cattura della libreria (SOPHiA GENETICS™ Dx RNA Library Prep Kit IV - 32 reazioni) e la pipeline analitica bioinformatica utilizzata in combinazione con la modalità SOPHiA DDM™ Dx.

- Il kit è composto da reagenti e protocolli per supportare la preparazione e la caratterizzazione di librerie target, compatibili con Illumina®, di RNA estratto da campioni FFPE di tumore al polmone, adatte per la caratterizzazione e il sequenziamento su sequenziatore Illumina® NextSeq® 550.
- Lo scopo principale della pipeline bioinformatica è quello di eseguire il filtraggio, l'allineamento e la fusione delle letture, il rilevamento dell'exon skipping (analisi secondaria) e l'annotazione (analisi terziaria), per stabilire la fusione SOPHiA DDM™ Dx ROS e il rilevamento dell'exon skipping.
- La modalità SOPHiA DDM™ Dx ospita la pipeline bioinformatica e funge da interfaccia grafica per il caricamento dei dati di sequenziamento di nuova generazione (NGS) e la generazione e il download del report SOPHiA DDM™ Dx ROS. Per le istruzioni operative, fare riferimento al Manuale d'uso della modalità SOPHiA DDM™ Dx.

Figura 1. Panoramica dei componenti del prodotto





4. MODALITÀ SOPHiA DDM™ DX

La modalità SOPHiA DDM™ Dx fornisce una soluzione software a medici e ricercatori per aiutarli a prendere decisioni e diagnosi informate in oncologia e nelle malattie ereditarie, comprese le condizioni difficili da diagnosticare come le malattie rare. Lo fa attraverso l'analisi dei dati di sequenziamento di nuova generazione prodotti da librerie di genomi interi, librerie di kit di cattura di DNA o RNA e kit di ampliconi per applicazioni germinali e somatiche. La modalità SOPHiA DDM™ Dx è destinato all'uso da parte di professionisti di laboratorio, genetisti clinici e patologi molecolari.

Per accedere alla piattaforma per la prima volta, l'utente dovrà registrarsi. All'utente sarà richiesto di:

- Selezionare l'opzione "*Sign-up now*".
- Inserire l'indirizzo e-mail. È necessario utilizzare lo stesso indirizzo e-mail utilizzato per la creazione dell'account al momento della configurazione dello stesso. In caso di dubbi, contattare l'amministratore del proprio account.
- Selezionare "*Send verification code*".
- Il codice di verifica verrà inviato all'indirizzo e-mail. Inserire il codice ricevuto via e-mail e completare la procedura inserendo il proprio nome e creando una nuova password.

Le istruzioni dettagliate per accedere alla piattaforma ed eseguire una richiesta di analisi genomica sono disponibili nel manuale d'uso della modalità SOPHiA DDM™ Dx.



5. MATERIALI E METODI DEL KIT

5.1. 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.

5.1.1. Contenuto del kit (32 campioni)

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

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

- Universal Blockers - TS Mix (12 µl)
- Human Cot DNA (25 µl)
- ROS_v1 probes by SOPHiA GENETICS (18 µl)
- 2x tampone di ibridazione (75 µl)
- Potenziatore per tamponi di ibridazione (30 µl)
- 2x tampone di lavaggio sfere (1250 µl)
- 10x tampone di lavaggio stringente (200 µl)
- 10x tampone di lavaggio I (160 µl)
- 10x tampone di lavaggio II (110 µl)
- 10x tampone di lavaggio III (110 µl)
- 32 primer per doppio indice univoco V2 compatibili con Illumina® in formato piastra a 96 pozzetti (7 µl ciascuno): vedere l'Appendice II per la descrizione e le sequenze dei primer.
- Mix di primer Illumina® post-cattura (20 µl)
- Potenziatore PCR (20 µl)
- Master mix PCR post-cattura 2x (122 µl)

BOX 2 (CONSERVARE TRA +2 °C E +8 °C)

- Dynabeads® M-270 Streptavidin (440 µl)
- Agencourt® AMPure® XP (11.6 ml)
- IDTE tampone basso TE (10 ml)
- Acqua senza nucleasi (20 ml)



SOPHiA GENETICS™ Dx RNA Library Prep Kit IV* (CONSERVARE TRA -25°C E -15°C)

- Primer RT (85 µl)
- Tampone di reazione RT (170 µl)
- Mix enzima RT (86 µl)
- Tampone di reazione per il secondo filamento (340 µl)
- Mix enzima per il secondo filamento (170 µl)
- Tampone di reazione di fine preparazione (296 µl)
- Mix enzima di fine preparazione (128 µl)
- Master Mix legatura (1268 µl)
- Potenziatore di legatura (44 µl)
- Adattatore universale Stubby (220 µl)
- Master Mix PCR (2 x 520 µl)
- Acqua senza nucleasi (2 x 1,8 ml)

* Per 32 campioni viene fornito un kit da 32 campioni.

* 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	Frasi 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 la manipolazione. • 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: Chiamare immediatamente un centro antiveneni/un medico. • P302+P352 Se sulla pelle: Lavare con abbondante acqua. • P308+P311 In caso di esposizione o di possibile esposizione: Chiamare un centro antiveneni 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 contenuto/contenitore in	Pericolo	Cloruro di ammonio tetrametilico Concentrazione: 49% CAS: 75-57-0



Nome del prodotto	GHS Pittogramma	Frase H e P	Parole di segnalazione	Componente pericoloso
Potenziatore per tamponi di ibridazione		conformità alle normative nazionali. • H351 Sospettato di causare il cancro. • H360 Può nuocere alla fertilità o al nascituro. • H373 Può causare 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. • 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 contenuto/contenitore in conformità alle normative nazionali.	Pericolo	Formammide Concentrazione: 100% CAS: 75-12-7
10x tampone di lavaggio stringente		• H302 Nocivo se ingerito. • H315 Provoca irritazione cutanea. • H319 Provoca grave irritazione oculare.	Pericolo	Sale sodico dell'acido etilendiamminotetracetico 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.	Pericolo	Dodecilsolfato sodico Concentrazione: 4,9% CAS: 151-21-3



Nome del prodotto	GHS Pittogramma	Frase H e P	Parole di segnalazione	Componente pericoloso
		- P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. - P305+P351+P338 Se a contatto con gli occhi: Sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. - P310 Chiamare immediatamente un centro antiveneni/un medico. - P501 Smaltire il contenuto/contenitore in conformità alle normative nazionali.		

Usare  e  come dispositivo di protezione individuale.

5.1.2. Materiale richiesto (non fornito)

MATERIALI FORNITI DALL'UTENTE (DA ACQUISTARE SEPARATAMENTE)

- 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®.

RNA isolato dal materiale di riferimento Seraseq® FFPE Tumor Fusion RNA v4 (Seracare, prodotto n. 0710-0496) può essere utilizzato come riferimento di controllo positivo. L'elaborazione di 50 ng di RNA con SOPHiA DDM™ Dx ROS dovrebbe consentire la rilevazione di tutti i riarrangiamenti target presenti in questo materiale.



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
 - Attrezzatura e reagente 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)
 - Termoblocco o a bagnomaria (compatibile con provette da 1,5 ml)
 - Miscelatore a vortice



5.2. Preparazione libreria

5.2.1. Preparazione RNA totale

MATERIALI

- RNA estratto da tessuti inclusi in paraffina e fissati in formalina (FFPE RNA) (*vedi nota sotto).
- IDTE
- Acqua senza nucleasi
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml



Nota: I campioni di tessuto FFPE di input devono essere sottoposti a deparaffinizzazione istologica standard seguita da purificazione dell'RNA. Il metodo di purificazione dell'RNA scelto deve garantire un'efficiente conservazione dell'RNA e la rimozione di altri componenti, come emoglobina, EDTA, sali, detergenti, proteinasi, solventi organici e altri composti che hanno un impatto potenzialmente negativo sulle successive reazioni enzimatiche. Si raccomanda di conservare l'RNA purificato in una soluzione tampone composta da 10 mM Tris a pH 7,5 o 8,0 e 0,1 mM EDTA.



IMPORTANTE: SOPHiA DDM™ Dx ROS è destinato a campioni con un contenuto tumorale di almeno il 20%. L'elaborazione di RNA da campioni con un contenuto di tumori inferiore al 20% non è compatibile con la soluzione.

Manipolazione dell'RNA

Le ribonucleasi (RNasi) sono enzimi altamente prevalenti e stabili in grado di degradare rapidamente le molecole di RNA. Pertanto, quando si lavora con l'RNA, è necessario prendere alcune precauzioni per evitare la contaminazione da RNasi:

- Prima di lavorare con l'RNA, decontaminare il luogo di lavoro, utilizzare guanti, pipette e prodotti per la pulizia delle nucleasi.
- Mantenere l'RNA purificato in ghiaccio durante il lavoro e conservarlo a -80°C.
- Indossare un camice da laboratorio e cambiare spesso i guanti.
- Usare materiale plastico monouso privo di nucleasi, protezioni per pipette con barriera anti-aerosol e reagenti privi di nucleasi.

Integrità dell'RNA

La qualità del RNA estratto da FFPE è variabile e potrebbe influenzare i dati di sequenziamento. L'esposizione alla formalina danneggia l'integrità delle molecole dando luogo a frammentazione degli acidi nucleici e modifiche chimiche. Inoltre, induce artefatti di sequenziamento dovuti a eventi di deaminazione.

L'integrità dell'RNA dei campioni FFPE deve essere valutata prima dell'esperimento utilizzando l'elettroforesi capillare ad alta risoluzione (ad esempio, sistemi Agilent Fragment Analyzer™, Agilent Bioanalyzer™, Agilent TapeStation™).



IMPORTANTE: L'elaborazione di un campione senza misurare il DV200 (percentuale di frammenti di RNA con dimensioni di almeno 200 bp) o un DV200 inferiore al 20% può portare a una resa non ottimale della preparazione delle librerie e a una qualità insufficiente dei dati NGS, con possibili risultati inconsistenti (vedere la sezione Avvertenze e limitazioni).



Quantificazione dell'RNA

Per pipettare con precisione la quantità corretta di soluzione di RNA di input, si consiglia di eseguire una diluizione iniziale per ottenere una concentrazione compresa tra 10 e 50 ng/μl. La concentrazione di RNA deve essere confermata da una quantificazione fluorimetrica (ad esempio, Qubit™, Thermo Fisher) e il valore ottenuto deve essere utilizzato per calcolare la diluizione finale.

Requisiti della quantità di input e cicli di PCR

Il flusso di lavoro è stato ottimizzato per i campioni di RNA FFPE. La quantità di input raccomandata è di 50 ng di RNA totale. La preparazione delle librerie è possibile con quantità di input che vanno da 10 ng a 200 ng; tuttavia, le caratteristiche di prestazione di quantità diverse da 50 ng non sono state stabilite sistematicamente.

A seconda della metrica DV200 per ciascun campione, regolare il numero di cicli PCR per l'amplificazione della libreria (Sezione 5.2.9) in base alla seguente tabella:

Tabella 2. Numero di cicli di PCR necessari in funzione della qualità del materiale di partenza.

FFPE DV200 < 50%	FFPE DV200 ≥ 50%
12	10

NOTA:

- L'utilizzo di quantità di RNA inferiori a 50 ng potrebbe richiedere l'esecuzione di cicli di PCR aggiuntivi durante l'amplificazione della libreria per garantire una resa sufficiente.
- Si sconsiglia l'uso di campioni con DV200 < ~20%, poiché potrebbe comportare una riduzione delle prestazioni del test.

PROCEDURA

1. Scongela i campioni di RNA sul ghiaccio.
2. Preparare le seguenti strisce PCR in base al numero di reazioni:

Quando si dispongono i campioni, si raccomanda di collocare in provette adiacenti i campioni sottoposti a sintesi di cDNA, che saranno successivamente amplificati con lo stesso numero di cicli di PCR. Questo faciliterà la separazione delle provette per la fase di PCR.

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



3. Preparare una diluizione per ciascun campione di RNA estratto da FFPE (RNA FFPE) di alta qualità nel numero appropriato di strisce PCR come segue:

DILUIZIONE RNA FFPE	
RNA FFPE 1-12 µl	RNA FFPE (cfr. tabella 2 nella pagina precedente Sezione 5.2)
IDTE	Completare a 12 µl

- Mescolare brevemente pipettando delicatamente su e giù 5 volte e centrifugare brevemente in una microcentrifuga per raccogliere tutto il liquido. Conservare i campioni nel ghiaccio.



Suggerimento: Punto di arresto sicuro durante la notte o per un periodo più lungo a -80°C.

5.2.2. Preparazione dei pre-mix e dei reagenti

COMPONENTI E REAGENTI

- Tampone di reazione RT
- Mix enzima RT
- Tampone di reazione per il secondo filamento
- Mix enzima per il secondo filamento
- Tampone di reazione di preparazione finale
- Mix enzima di preparazione finale
- Potenziatore di legatura
- Master Mix legatura
- Master Mix PCR 2x
- Acqua senza nucleasi
- Sfere AMPure® XP equilibrate a temperatura ambiente

PREPARAZIONE

- Rimuovere i componenti del SOPHiA GENETICS™ Dx RNA Library Prep Kit IV da -20°C e scongelarli sul ghiaccio.
- Rimuovere la piastra primer per doppio indice univoco 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 a temperatura ambiente per almeno 30 minuti. Vorticare accuratamente le sfere AMPure® XP, per garantire una corretta risospensione delle stesse, prima di utilizzarle in tutte le fasi successive.
- Preparare l'etanolo all'80% (volume secondo il seguente schema in base al numero di reazioni):

80% ETANOLO				
Numero di reazioni	8	16	24	32
80% Etanolo (in ml)	20	30	40	50

- Assicurarsi che il tampone di reazione del SOPHiA GENETICS™ Dx RNA Library Prep Kit IV sia completamente scongelato. Se si nota un precipitato nel tampone, pipettare più volte verso l'alto e verso il basso per romperlo e vorticare per mescolare fino alla completa risospensione. Mettere nel ghiaccio fino al momento dell'uso.
- Mescolare bene e centrifugare tutti i reagenti prima dell'uso e metterli nel ghiaccio.



PRE-MIX

1. Preparare il **pre-mix RT** come segue:

PRE-MIX RT				
Numero di reazioni	8	16	24	32
Tampone di reazione RT (in µl)	38,4	76,8	115,2	153,6
RT Enzyme Mix (FX Mix enzimi) (in µl)	19,2	38,4	57,6	76,8

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

2. Preparare il **pre-mix per la sintesi del secondo filamento** come segue:

PRE-MIX PER LA SINTESI DEL SECONDO FILAMENTO				
Numero di reazioni	8	16	24	32
Tampone di reazione per il secondo filamento (in µl)	76,8	153,6	230,4	307,2
Mix enzima per il secondo filamento (in µl)	38,4	76,8	115,2	153,6
Acqua senza nucleasi (in µl)	460,8	921,6	1382,4	1843,2

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

3. Preparare il **pre-mix di preparazione finale** come segue:

PRE-MIX DI PREPARAZIONE FINALE				
Numero di reazioni	8	16	24	32
Tampone di preparazione finale (in µl)	67,2	134,4	201,6	268,8
Mix enzima di preparazione finale (in µl)	28,8	57,6	86,4	115,2

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

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

PRE-MIX DI LEGATURA				
Numero di reazioni	8	16	24	32
Master Mix legatura (in µl)	290	580	870	1160
Potenziatore di legatura (in µl)	9,7	19,3	28,95	38,6

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



IMPORTANTE: Il mix di legatura e il pre-mix enzima del secondo filamento sono altamente viscosi; pipettare delicatamente e assicurarsi di ottenere un pre-mix di legatura omogeneo.

5.2.3. Retrotrascrizione (RT) - RNA FFPE

MATERIALI

- Campioni di RNA FFPE diluiti (12 µl)
- Primer RT
- Pre-mix RT
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

PREPARAZIONE

1. Preparare il termociclatore per RT con le seguenti impostazioni:

	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (IN MINUTI)
Coperchio	99	
Passaggio 1: Annealing del primer	65	5
Passaggio 2: Mantenere	4	∞
Passaggio 3: Estensione del primer	25	10
Passaggio 4: Retrotrascrizione	42	15
Passaggio 5: Disattivazione dell'enzima	70	15
Passaggio 6: Mantenere	4	∞

Nota: Se la macchina PCR non consente di mettere il programma in attesa e poi di riattivarlo per il passaggio successivo, è possibile utilizzare due programmi separati per i passaggi 1-2 e per i passaggi 3-6.

2. Avviare il programma RT. Quando il blocco raggiunge il passaggio 1, 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 di frammentazione enzimatica.

1. Per facilitare il pipettaggio, creare una riserva di primer RT in un nuovo set di strisce PCR secondo il seguente schema:

NUMERO DI REAZIONI	8	16	24	32
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Primer RT (in µl)	4,5	4,5	7,0	9,0



2. Per facilitare il pipettaggio, creare una riserva di pre-mix RT in un nuovo set di strisce PCR secondo il seguente schema:

NUMERO DI REAZIONI	8	16	24	32
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Pre-mix RT (in μ l)	13	13	19,5	26,5

3. Assemblare la reazione come segue:

- Con una pipetta multicanale, aggiungere 2 μ l di primer RT ai 12 μ l di campione RNA FFPE.
- Miscelare pipettando su e giù per 5 volte e centrifugare brevemente in microcentrifuga.

4. Mettere le provette nel termociclatore precedentemente riscaldato a 65°C con il programma RT. Lasciare le provette nel termociclatore durante le fasi 1 e 2 (incubazione a 65°C e raffreddamento a 4°C). Una volta che i campioni hanno raggiunto i 4°C, togliere le provette dal termociclatore, centrifugarle brevemente e continuare ad assemblare la reazione (con ghiaccio) come segue:

- Con una pipetta multicanale, aggiungere 6 μ l di pre-mix RT ai 14 μ l di campioni di RNA e primer RT (20 μ l in strisce da 4 o 8 provette).
- Miscelare pipettando su e giù per 5 volte e centrifugare brevemente in microcentrifuga.



Importante: Le provette devono essere tenute in ghiaccio prima e dopo l'incubazione a 65°C per evitare la degradazione delle molecole di RNA.

5. Mettere la reazione nel termociclatore e continuare il programma RT (fasi 3-6).

Procedere immediatamente con la sintesi del secondo filamento di cDNA

5.2.4. Sintesi del secondo filamento di cDNA

MATERIALI

- Prodotto di reazione RT in 20 μ l
- Pre-mix del secondo filamento

PREPARAZIONE

- Impostare il termociclatore a 16 °C (coperchio aperto).

PROCEDURA



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

1. Per facilitare il pipettaggio, creare una riserva di pre-mix per il secondo filamento aggiungendo i seguenti volumi a un nuovo set di strisce da 4 o 8 provette secondo il seguente schema:



NUMERO DI REAZIONI	8	16	24	32
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Pre-mix del secondo filamento (in µl)	135	135	203	270

2. Assemblare la reazione come segue:

- Con una pipetta multicanale, aggiungere 60 µl di pre-mix del secondo filamento ai 20 µl di prodotto RT.
- Miscelare pipettando su e giù per 5 volte e centrifugare brevemente in microcentrifuga.

3. Incubare nel termociclatore a 16 °C per 1 ora (coperchio aperto).

Procedere immediatamente alla pulizia del cDNA.

5.2.5. Pulizia del cDNA

MATERIALI

- Prodotti di sintesi del secondo filamento di cDNA in 80 µl
- 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 120 µl di sfere AMPure® XP al prodotto di sintesi del cDNA second strand da 80 µl. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte.
2. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare brevemente per rimuovere il liquido dalle pareti della provetta.
3. 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.
4. Scartare accuratamente il surnatante con 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 ancora 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 acido nucleico recuperato.

Rimuovere le provette dal rack magnetico.

10. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 53 µl di IDTE alle sfere per eluire il cDNA.
11. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
12. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e, se necessario, centrifugare brevemente per rimuovere il liquido dalle pareti della provetta.
13. 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.
14. Trasferire con cautela 50 µl del cDNA eluito in una nuova provetta da 0,2 ml etichettata per strisce da 8 provette.



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

5.2.6. Riparazione finale e A-tailing

MATERIALI

- cDNA pulito in 50 µl ognuno
- Pre-mix di preparazione finale
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

PREPARAZIONE

- Programmare il termociclatore per la preparazione finale con le seguenti impostazioni:

	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (IN MINUTI)
Coperchio	75	
Passaggio 1	4	1
Passaggio 2	20	30
Passaggio 3	65	30
Mantenere	4	∞

- Avviare il programma di preparazione finale 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. Per facilitare il pipettaggio, creare una riserva di pre-mix di fine preparazione aggiungendo i seguenti volumi in un nuovo set di strisce da 4 o 8 provette secondo il seguente schema:

NUMERO DI REAZIONI	8	16	24	32
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Pre-mix di preparazione finale (in µl)	22	22	33	44

2. Assemblare la reazione come segue:
 - Con una pipetta multicanale, aggiungere 10 µl di pre-mix di preparazione finale ai 50 µl di campioni di cDNA (60 µl in strisce da 4 o 8 provette).
 - Usando una pipetta multicanale impostata su 40 µl, mescolare attentamente pipettando su e giù 5 volte e centrifugare brevemente in una microcentrifuga.
3. Mettere nel termociclatore e continuare il programma di preparazione finale.

Procedere immediatamente alla legatura.

5.2.7. Legatura

MATERIALI

- Prodotti di reazione della riparazione finale e A-tailing (ER&AT) in 60 µl ciascuno
- Pre-mix di legatura
- Adattatore universale Stubby
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

PREPARAZIONE

- Durante l'incubazione ER&AT, preparare nuove strisce PCR con 5 µl di adattatore universale Stubby per provetta in base alla propria strategia di indicizzazione, secondo il seguente schema:

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

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



PROCEDURA

1. Per facilitare il pipettaggio, creare una riserva di pre-mix di legatura in un nuovo set di strisce PCR secondo il seguente schema:

NUMERO DI REAZIONI	8	16	24	32
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Pre-mix legatura (in µl)	70	70	105	140

2. Usando una pipetta multicanale, trasferire 60 µl di ciascun prodotto di reazione ER&AT alle strisce da 4 o 8 provette contenenti 5 µl di adattatori universali Stubby.
3. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
4. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 31 µl di pre-mix di legatura a ciascun prodotto di reazione ER&AT (96 µl in ciascuna provetta della striscia da 4 o 8 provette).
5. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 60 µl, mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
6. Incubare nel termociclatore a 20 °C per 15 minuti (coperchio aperto).

Procedere alla pulizia post legatura.



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

5.2.8. Pulizia post-legatura

MATERIALI

- Prodotti di reazione legati in 96 µl ciascuno
- Sfere AMPure® XP equilibrate a temperatura ambiente
- Etanolo appena preparato all'80%
- Acqua senza nucleasi
- IDTE
- 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 96 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, se necessario.
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 ancora 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 µl di IDTE alle sfere.
Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.

Procedere all'amplificazione della libreria.

5.2.9. Amplificazione della libreria

MATERIALI

- Prodotti di reazione legati e sfere risospese in 20 µl di IDTE ciascuno
- Master Mix PCR 2x
- 32 piastre primer per doppio indice univoco per Illumina®

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	
Passaggio 3: Annealing	60	30	numero dei cicli*
Passaggio 4: Estensione	72	30	
Passaggio 5: Estensione finale	72	60	
Mantenere	10	∞	



* Seguire la tabella 2 (sezione 5.2.1 Preparazione completa dell'RNA) per determinare il numero di cicli PCR in base alla quantità di materiale di partenza.

PROCEDURA

1. Per facilitare il pipettaggio, creare una riserva di Master Mix PCR 2x aggiungendo i seguenti volumi a un nuovo set di strisce da 4 o 8 provette secondo il seguente schema:

NUMERO DI REAZIONI	8	16	24	32
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Master Mix PCR 2x (in µl)	60	60	90	120

2. Assemblare la reazione come segue:
 - Utilizzando una pipetta multicanale, aggiungere 5 µl di un primer per doppi indici univoci diverso per provetta ai prodotti di ligazione e alle sfere, in base alla strategia di indicizzazione.
 - Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
 - Con una pipetta multicanale, aggiungere 25 µl di Master Mix PCR 2x ai prodotti di legatura e alle sfere (25 µl in strisce da 4 o 8 provette). 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.

5.2.10. 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, se necessario.



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 ancora 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 µl 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 rimuovere il liquido dalle pareti della provetta.
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 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.

5.3. Quantificazione individuale della libreria e controllo qualità

MATERIALI

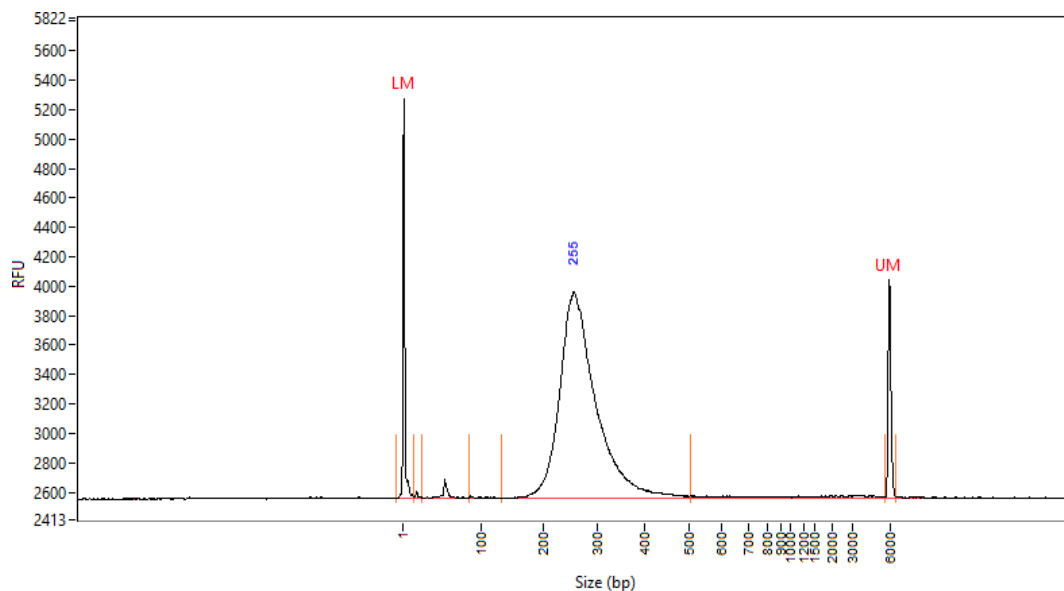
- Attrezzatura e reagenti per la quantificazione fluorometrica
- Sistema di elettroforesi capillare
- Acqua senza nucleasi
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

PROCEDURA

1. Preparare una diluizione quadrupla di ciascuna libreria con acqua senza nucleasi (ad es., 2 µl di biblioteca in 6 µl di acqua senza nucleasi).
2. Quantificare le librerie con un metodo fluorometrico (ad es. quantificazione con Qubit HS utilizzando 2 µl della diluizione quadrupla della libreria precedente).



- Controllare la qualità delle librerie analizzandone il profilo tramite elettroforesi capillare. I frammenti di DNA della libreria dovrebbero avere una distribuzione delle dimensioni fra 200 bp e 800 bp, con un netto picco nell'intervallo di 200-400 bp.



Esempio di distribuzione della libreria pre-catturata ottenuta con sistema di elettroforesi capillare Agilent Fragment Analyzer™; UM - marcatore superiore, LM - marcatore inferiore.

5.4. Cattura

5.4.1. Pooling della libreria per ibridazione e cattura

MATERIALI

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

PROCEDURA

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

NUMERO DI CATTURE	1	2	3	4
Human Cot DNA (in µl)	5	11	16,5	22
Blocchi universali - TS Mix (in µl)	2	4,4	6,6	8,8



3. Se si stanno eseguendo due o più catture, pipettare 7 µl del pre-mix precedente in singole provette a basso legame con il DNA.
4. Aggiungere un pool di 8 librerie individuali utilizzando 200 ng di ciascuna (per un totale di 1600 ng) per ogni cattura nelle singole provette contenenti il pre-mix sopra indicato.
5. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
6. 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.

5.4.2. Ibridazione

MATERIALI

- Librerie liofilizzate
- 2X tampone di ibridazione
- Potenziatore per tamponi di ibridazione
- ROS_v1 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 4 al punto 6: 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 - 16 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 330μl 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 un'aliquota di 330μl 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.

5.4.3. 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.



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.

5.4.4. 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.

5.4.5. 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



Assicurarsi che la temperatura rimanga vicina ai 65°C per le fasi 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.

5.5. Amplificazione post-cattura

MATERIALI

- Sospensione di sfere di streptavidina/acqua senza nucleasi (20 µl)
- Master mix PCR post-cattura 2X
- Mix di primer Illumina® post-cattura
- Potenziatore PCR
- Acqua senza nucleasi



PREPARAZIONE

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

	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (IN SECONDI)	
Coperchio	99	-	15 cicli
Passaggio 1: Denaturazione iniziale	98	120	
Passaggio 2: Denaturazione	98	20	
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
Master Mix PCR post-cattura 2X (in µl)	25	55	82,5	110
Mix di primer Illumina® post-cattura (in µl)	2,5	5,5	8,25	11
Potenziatore PCR (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.



5.6. 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 rimuovere il liquido dalle pareti della provetta.
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 rimuovere il liquido dalle pareti della provetta.
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.



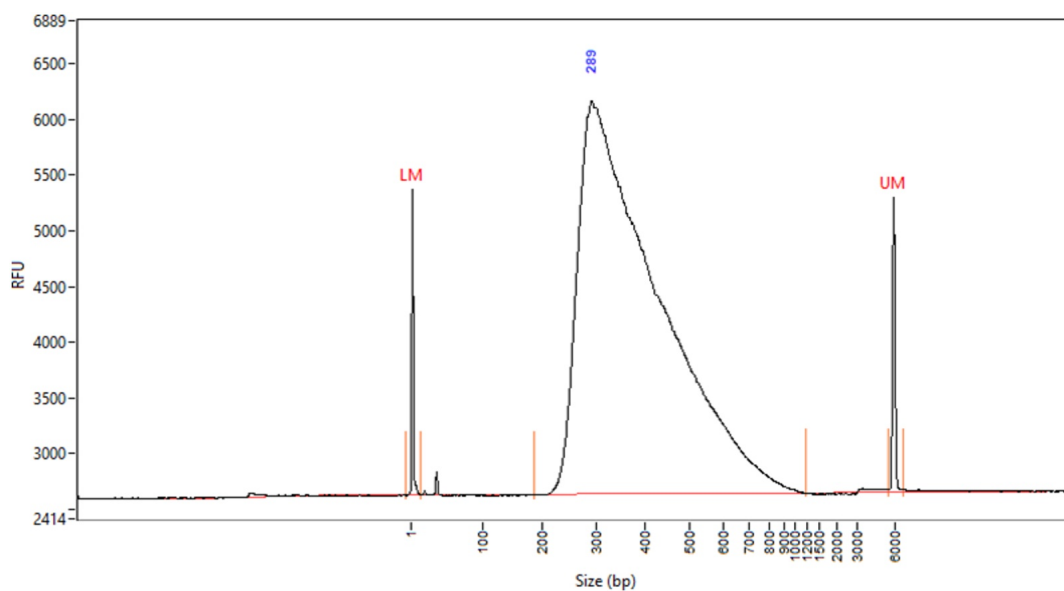
5.7. Quantificazione finale della libreria e controllo qualità

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 200 bp e 800 bp, con un netto picco nell'intervallo di 200-400 bp.



Esempio di distribuzione delle dimensioni del pool della libreria post-cattura ottenuta con sistema di elettroforesi capillare Agilent Fragment Analyzer™. LM si riferisce al marcatore inferiore, UM al marcatore superiore.

5.8. Preparazione della libreria per il sequenziamento

MATERIALI

- Kit Mid-Output Illumina® NextSeq® 550 v2.5 (300 cicli)
- 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 5.7 come segue:

$$\text{Molarità della libreria} = \frac{\text{Concentrazione della libreria (ng/μl)}}{\text{dimensione media in paia di basi} \times 649.5} \times 10^6$$

2. Diluire ciascun pool di cattura a 4 nM.
3. Se si elaborano più pool di sequenziamento, mescolarli in quantità uguali (ad esempio, 5 μl di ciascuno) seguendo la tabella delle raccomandazioni di sequenziamento riportata di seguito:

TIPO DI KIT NEXTSEQ 550 SYSTEM	MASSIMO DI CAMPIONI PER STUDIO
Mid-Output	Fino a 86

4. Mescolare bene e utilizzare questa diluizione secondo le raccomandazioni per la denaturazione standard Illumina®.
5. Per la diluizione del dosaggio, vedere la tabella seguente:

TIPO DI KIT NEXTSEQ 550 SYSTEM	DILUIZIONE DEL DOSAGGIO
Mid-Output	1,3 pM
[Regolare la diluizione (intervallo da 1,1 pM a 1,5 pM) in base al numero di cluster ottenuti nel primo studio]	

6. Per le letture consigliate per ogni campione, vedere la tabella seguente:

LUNGHEZZA DELLA LETTURA (IN BP)	LETTURE TOTALI RACCOMANDATE PER CAMPIONE	COPPIE DI LETTURE (FRAMMENTI) RACCOMANDATE PER CAMPIONE
2 X 150	3 milioni	1,5 milioni



6. PROCEDURA DI ANALISI

6.1. Demultiplexing dei dati NGS

L'utente dovrebbe eseguire il demultiplexing dei dati NGS seguendo le istruzioni fornite dal manuale d'uso del sequenziatore Illumina® NextSeq® 550 (NextSeq® 550 Systems Guide, documento n. 15069765 v07). Come indicato da Illumina®, il demultiplexing autonomo per le analisi di terze parti può essere eseguito con bcl2fastq v2.0 o superiore (bcl2fastq2 Conversion Software v2.20 Software Guide, Documento n. 15051736 v03).



Nota: Gli utenti devono tenere presente che l'uso dell'opzione no-lane-splitting in bcl2fastq o l'uso di altri flussi di lavoro di demultiplexing automatizzati può comportare nomi di file incompatibili con la modalità SOPHiA DDM™. Per istruzioni più precise, consultare il manuale d'uso della modalità SOPHiA DDM™ Dx.

6.2. Caricamento e analisi dei dati

L'utente accede all'applicazione SOPHiA DDM™ e seleziona SOPHiA DDM™ Dx RNAtarget Oncology Solution nella finestra "My product(s)" per avviare il caricamento dei dati NGS. Per creare una nuova richiesta di analisi genomica, consultare la sezione "Creare una richiesta di analisi" nel manuale d'uso della modalità SOPHiA DDM™ Dx. Al termine dell'analisi, gli utenti riceveranno una notifica via e-mail. Se non si riceve una notifica entro 24 ore dall'inizio del processo di caricamento dei dati, è necessario contattare l'assistenza.



Nota: Tutti i campioni della richiesta di analisi devono essere stati elaborati nell'ambito dello stesso sequenziamento e preparati con gli stessi reagenti di analisi.

6.3. Generazione di report

Dopo che i file di sequenziamento (FASTQ) sono stati caricati con successo, l'avanzamento dell'analisi può essere monitorato nel widget "My Genomic Analysis Requests" nella dashboard o dal browser. Una volta completato, è possibile accedere e scaricare in formato PDF il report generato da SOPHiA DDM™ Dx ROS per ciascun campione della richiesta. Il manuale d'uso della modalità SOPHiA DDM™ può essere utilizzato per ottenere istruzioni dettagliate sull'analisi.



Figura 2. Esempio di un report SOPHiA DDM™ Dx ROS con il primo risultato possibile del test, vedere tabella 3.

CE-IVD Report

2022, Mar 18

SOPHiA DDM Dx RNAtarget Oncology Solution ReportPatient ID
patient1Sample ID
Sample name 1**// Analysis**Request name
My super runCE-IVD Product
SOPHiA DDM Dx RNAtarget Oncology SolutionSOPHiA DDM Dx version
0.0.0**// Quality metrics for genomic sample**Control gene coverage
948.0Quality status
PASS**// Detected fusions**Detected fusionsFGFR4(NM_001291980;ex1)::ARHGAP4(NM_001164741;ex2)**Signature** _____**// Intended purpose**

SOPHiA DDM Dx RNAtarget Oncology Solution (ROS, "the Product") is intended to be used to identify clinically relevant gene fusions involving the genes ALK, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, NRG1, NTRK1, NTRK2, NTRK3, RET and ROS1, and exon-skipping events in EGFR and MET in RNA extracted from FFPE samples of patients with diagnosed lung cancer by targeting specific transcripts. The function of the Product is to provide an aid to healthcare professionals to make clinical decision(s) related to gene fusions / exon skipping events and to provide molecular rationale for the appropriate disease management strategy.

The Product is a semi-automated, qualitative device intended to be used as an in-vitro diagnostic for professional use only.

Request number:12345

Patient ID: patient1

1 / 1

Report date: 2022, Mar 18 10:03:12 UTC+01:00

Sample ID: Sample name 1



Viene visualizzato il report SOPHiA DDM™ Dx ROS: Eventi di fusione e/o di exon skipping rilevati da SOPHiA DDM™ Dx ROS, il punteggio di qualità del campione e lo stato di qualità del campione. La tabella 3 seguente fornisce una panoramica dei possibili risultati.

Tabella 3. Panoramica dei possibili risultati del test SOPHiA DDM™ Dx ROS

Eventi di fusione e/o di exon skipping rilevati da SOPHiA DDM™ Dx ROS	Punteggio di qualità	Stato di qualità	DESCRIZIONE
Positive	≥50	Pass	Chiamata positiva ad alta confidenza.
Positive	<50	Warning	Chiamata positiva ad alta confidenza con un avviso. Aumentato rischio di mancato rilevamento di ulteriori fusioni nel campione. Stato di qualità del campione WARNING quando la soglia del punteggio di qualità (copertura del gene di controllo) non è raggiunta.
Negative	≥50	Pass	Chiamata negativa ad alta confidenza.
Negative (Inconclusive)	<50	Warning	Chiamata negativa con un avviso. Aumentato rischio di falsi negativi e risultato inconcludente. Stato di qualità del campione WARNING quando la soglia del punteggio di qualità (copertura del gene di controllo) non è raggiunta.



7. DESCRIZIONE DELL'ANALISI E PARAMETRI

7.1. File delle risorse

L'allineamento viene eseguito rispetto al genoma di riferimento GRCh37 (indicato anche come hg19). Le fonti disponibili pubblicamente per tutti questi requisiti sono disponibili all'indirizzo:

genoma di riferimento GRCh37 - hg19:

https://storage.googleapis.com/genomics-public-data/references/b37/Homo_sapiens_assembly19.fasta.gz

La traduzione delle coordinate genomiche in etichette geniche e intervalli genomici (per geni, trascritti ed esoni) viene effettuata utilizzando un database interno di trascritti creato il 23 agosto 2016 utilizzando la versione di RefSeq disponibili tra la release 77 e la release 78 di RefSeq.

7.2. Geni target

I target comprendono un insieme di trascritti di estrema rilevanza clinica nei tumori polmonari avanzati. In particolare, il prodotto SOPHiA DDM™ Dx ROS ha come target gli esoni che sono noti per essere coinvolti in riarrangiamenti patogeni: eventi di exon skipping (MET ex14, EGFRvIII) o fusioni (ALK, FGFR1-4, NRG1, NTRK1-3, RET, ROS1). L'elenco completo degli esoni target per il rilevamento delle fusioni geniche è riportato nella tabella 4 (**numeri neri**). Nella tabella sono inclusi anche gli esoni che non sono specificamente target, ma per i quali le fusioni, se rilevate, non sarebbero escluse dal report (**numeri rossi**).

Tabella 4. Elenco degli esoni coinvolti in eventi di fusione genica rilevati da SOPHiA DDM™ Dx ROS

Simbolo del gene	Esoni consentiti quando il gene è il partner 5'.	Esoni consentiti quando il gene è il partner 3'.	Refseq Transcript ID
ALK	NA	2,3,4,5,6-9,10,11-15,16-20,21-29	NM_004304
FGFR1	1,2,3-8,9-11,12,13,14,15-18	2-6,7,8-10,11,12,13,14-16,17,18	NM_023110
FGFR2	1,2,3-5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18	2,3,4,5,6-9,10,11,12,13,14-17,18	NM_000141
FGFR3	2,3,4,5,6,7-12,13,14,15,16,17,18	4,5,6-9,10,11,12,13-17,18	NM_000142
FGFR4	2,3-6,7,8-10,11,12-15,16,17,18	2,3-6,7,8-17,18	NM_213647
NRG1	NA	2,3,4,5,6,7,8,9-12	NM_013964
NTRK1	NA	7-13,14-17	NM_002529
NTRK2	NA	9,10,11-13,14,15,16,17,18-21	NM_006180
NTRK3	NA	7,8-11,12,13,14,15,16,17,18-20	NM_001012338
RET	NA	2,3-10,11,12,13-16,17,18-20	NM_020975
ROS1	NA	32-36,37-42,43	NM_002944

neri= esoni target per i quali è possibile rilevare le fusioni e che verranno segnalate;

rossi=esoni non target, ma per i quali le fusioni saranno comunque segnalate se rilevate.



7.3. Pre-elaborazione dei dati grezzi

7.3.1. Pre-elaborazione

Nelle fasi iniziali dell'elaborazione dei dati, i file fastq.gz vengono ridotti a una dimensione massima di 200 MB. La dimensione del file originale e la dimensione dopo la riduzione sono riportate nel report del controllo della qualità. Successivamente, vengono raccolte le metriche sulla qualità dei dati in base ai file fastq dopo la riduzione.

7.3.2. Allineamento

Le letture sono allineate con STAR-2.7.0f_0328 utilizzando impostazioni single-end. Vengono generati i seguenti file:

- a. File bam principale: Contiene tutte le letture che coprono una singola posizione nel genoma (cioè senza interruzioni) o che coprono diverse posizioni in modo lineare, cioè coerenti con un evento di splicing. Questo file viene utilizzato per il rilevamento dell'exon skipping.
- b. File di giunzione chimerica: Contiene le letture che coprono due o più posizioni nel genoma ma che non si allineano in modo lineare. Poiché si tratta del tipo di letture tipicamente coinvolte in un riarrangiamento, questo file viene utilizzato per il rilevamento delle fusioni. Per una descrizione più dettagliata di un allineamento chimerico, l'utente può fare riferimento a (Dobin et al., 2013)⁴.

7.4. Elenco dei moduli inclusi

I risultati restituiti dalla pipeline analitica nel report IVD sono le chiamate di fusione e/o di exon skipping e un indicatore di qualità per ciascun campione.

7.4.1. Modulo di chiamata di eventi di fusione genica/exon skipping:

Chiamata di fusione e di exon skipping

Il modulo di rilevamento di fusioni ed exon skipping comprende algoritmi che applicano test statistici per identificare eventi rilevanti da letture chimericamente allineate, funzioni di quantificazione e funzioni di filtraggio. Il modulo esegue le operazioni qui descritte:

- a. Identificare le fusioni candidate dal file di giunzione chimerica prodotto da STAR. Le fusioni candidate che coinvolgono RNA non codificanti o due regioni dello stesso gene non saranno prese in considerazione per l'analisi finale.
- b. Identificare gli eventi di exon skipping candidati dal file bam principale esaminando le prove di exon skipping negli allineamenti.
- c. Valutare la probabilità che un candidato sia un vero evento di fusione/exon skipping. Il modello statistico utilizzato considera quanto segue:
 - Il tipo di punto di rottura (rilevante solo per le fusioni). Ad esempio, in una tipica fusione in cui il punto di rottura è intronico per entrambi i partner, il tipo di punto di rottura sarà intron-intron. Altri tipi possono essere esone-introne o esone-esone. Le fusioni in cui il punto di rottura si trova nel mezzo di un esone



sono penalizzate e richiedono un supporto molecolare aggiuntivo per essere definite ad alta affidabilità, poiché questi tipi di eventi sono rari.

- La posizione di mappatura delle letture (rilevante solo per le fusioni). Ad esempio, in una tipica fusione in cui il punto di rottura è intronico per entrambi i partner, le letture mapperanno ai confini esone-introne di entrambi i partner. In questo caso la posizione di mappatura sarà esone-esone. Altri tipi di posizioni di mappatura possono essere esone-introne o introne-introne.
- Il numero di molecole che supportano l'evento.
- La conseguenza della codifica prevista.

In alcuni casi, una coppia di geni di fusione può avere fusioni multiple chiamate con punti di rottura diversi. In questo caso, verranno segnalate fusioni multiple.

Filtraggio e segnalazione delle fusioni e degli exon skipping

L'elenco delle fusioni restituito durante la fase di chiamata può contenere chiamate a bassa affidabilità generate da artefatti nei dati, eventi con un supporto di copertura molecolare insufficiente o chiamate ad alta affidabilità non supportate dall'ambito del prodotto. Tutte le fusioni che soddisfano i seguenti criteri sono considerate a bassa affidabilità e non appaiono nel report IVD:

- Chiamate di fusione in cui entrambi i partner sono annotati come appartenenti alla stessa famiglia genica sulla base dell'annotazione HGNC.
- Chiamate di fusione in cui entrambi i partner hanno un alto grado di omologia ma non sono annotati come appartenenti alla stessa famiglia di geni. L'omologia è definita come un allineamento BLAST tra il 5' gene e il 3' gene che produce un valore E- superiore a 50.
- Chiamate di fusione in cui almeno un partner è uno pseudogene.
- Chiamate di fusione in cui la coppia di geni è annotata in HGNC come locus-type "readthrough".
- Chiamate di fusione o di exon skipping con meno di 10 molecole di supporto.
- Chiamate di fusione in cui il 5' gene e il 3' gene sono sovrapposti.
- Chiamate di fusione in cui la sequenza intronica comprende parte del trascritto di fusione maturo.

Inoltre, affinché una fusione venga segnalata, almeno un partner deve essere elencato nella tabella 4 (con l'ID del trascritto corrispondente, l'orientamento all'interno della fusione e l'esone che confina con il punto di rottura).

Nota:

- Gli esoni partner visualizzati in rosso nella tabella 4 non sono target del test, ma potrebbero comunque essere rilevati (ad esempio, se un esone adiacente è un target).
- Le coordinate genomiche, invece dei simboli dei geni, saranno visualizzate per i geni non presenti nella tabella 1 (che elenca i geni clinicamente rilevanti).

Verranno segnalati solo i seguenti eventi di exon skipping: EGFR 1-8 (NM_005228), EGFR 1-9 (NM_005228) e MET 13-15 (NM_001127500).



7.4.2. Indicatore di qualità

Per ogni campione analizzato viene calcolato il seguente indicatore:

- Copertura del gene di controllo: questo valore rappresenta la copertura molecolare calcolata di un gene di controllo interno. Poiché si prevede che il gene di controllo selezionato sia ben espresso in vari tipi di tessuto, questa metrica viene utilizzata come proxy del tasso di conversione dell'RNA, ossia dell'efficienza con cui le molecole di RNA disponibili nel campione vengono convertite in frammenti che possono essere sequenziati e utilizzati per l'analisi.
- I campioni che presentano una copertura molecolare inferiore a 50x sono considerati di qualità subottimale e sono etichettati con lo stato di qualità "WARNING" nel report SOPHiA DDM™ Dx ROS. Questo stato indica che è stato sequenziato solo un piccolo numero di molecole uniche, probabilmente a causa della bassa qualità del materiale di input o di problemi tecnici nell'esecuzione del flusso di lavoro. Una qualità insufficiente dei dati può influire sulla capacità di rilevare eventi di fusione o di exon skipping. Una copertura di 50x o superiore è associata allo stato di qualità "PASS". Per ulteriori dettagli, consultare la sezione 6.3.



8. VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI

8.1. Valutazione delle prestazioni analitiche

8.1.1. Stato di fusione/exon skipping Concordezza con il campione NGS di confronto

Le prestazioni analitiche del rilevamento di fusione/exon skipping sono state testate utilizzando 50 ng di RNA derivato da 54 campioni clinici FFPE, tra cui 40 campioni di tumore al polmone e 14 derivati da altri tumori solidi. Lo stato di questi campioni è stato predeterminato con metodi NGS alternativi e confrontato con il risultato di SOPHiA DDM™ Dx ROS.

Campioni	Misurazione della performance	Osservato	intervallo di affidabilità inferiore al 95%
Complessivo (n=54)	Percentuale di accordo positivo	100%	88,65%
	Percentuale di accordo negativo	100%	99,99%
	Percentuale di accordo complessiva	100%	NA
Solo polmone (n=40)	Percentuale di accordo positivo	100%	79,61%
	Percentuale di accordo negativo	100%	99,99%
	Percentuale di accordo complessiva	100%	NA

8.1.2. Limite di rilevamento fusioni/exon skipping

Il limite di rilevamento (LoD) è stato stimato utilizzando le diluizioni di un campione di riferimento, contenente 14 riarrangiamenti target, e di un campione clinico, entrambi con un numero noto di molecole di fusione/exon skipping. Sono stati utilizzati 50 ng di RNA totale come input. Il LoD è stato misurato come il numero più basso di molecole di fusione presenti nel materiale di input in cui la sensibilità ha raggiunto $\geq 95\%$, con un intervallo di affidabilità del 95%.

Evento	LoD [molecole/50 ng di RNA]
FGFR3-BAIAP2L1	280
EML4-ALK	303
EGFRV8	258
CCDC6-RET	335
METex14	240
ETV6-NTRK3	296
CD74-ROS1	677
KIF5B-RET	78



Evento	LoD [molecole/50 ng di RNA]
LMNA-NTRK1	371
FGFR3-TACC3	69
SLC34A2-ROS1	187
NCOA4-RET	241
TFG-NTRK1	369
TPM3-NTRK1	213
CD74-NRG1	357*

*fusione valutata in un campione clinico

8.1.3. Ripetibilità dello stato di fusione/exon skipping

La ripetibilità è stata affrontata misurando l'accordo percentuale positivo (PPA)/negativo (NPA) in un esperimento costituito da 32 repliche di un campione di riferimento diluito, con 14 riarrangiamenti target, in modo che i diversi eventi fossero presenti in misura pari a ~0,9-6 volte il loro limite di rilevamento. Il 100% della ripetibilità è stato misurato per tutti i 13 eventi presenti al di sopra del loro limite di rilevamento.

8.2. Valutazione delle prestazioni cliniche

Le prestazioni cliniche di SOPHiA DDM™ Dx RNAtarget Oncology Solution sono state accertate in uno studio clinico su 22 campioni di RNA isolati da campioni FFPE di tumori polmonari. Lo stato clinico (cioè fusione/exon skipping positivo o negativo) di ciascun campione è stato predeterminato utilizzando il metodo NGS convalidato esternamente. 50 ng di RNA sono stati elaborati con SOPHiA DDM™ Dx ROS da un ente esterno e lo stato determinato è stato confrontato con quello prestabilito.

Parametro	Valore (95% C.I.)
Sensibilità diagnostica	100% [70,09%-100%]
Specificità diagnostica	100% [77,19%-100%]



9. AVVERTENZE, PRECAUZIONI E LIMITAZIONI

9.1. AVVERTENZE GENERALI

- Solo per le procedure di diagnostica in vitro. 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.
- SOPHiA DDM™ Dx ROS è stato convalidato per campioni di RNA FFPE di cancro del polmone (input di 50ng) con DV200 $\geq$ 20% (misurato con Agilent Fragment Analyzer™) e contenuto tumorale $\geq$ 20% (misurato con i metodi standard della patologia), sequenziato su Illumina® NextSeq® 550 (cella a flusso Mid-Output).
- La scarsa qualità dei dati NGS grezzi può confondere l'analisi dei dati e causare falsi positivi, falsi negativi e risultati inconsistenti.
- 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.
- Per evitare la contaminazione dei campioni, è necessario definire locali pre e post-PCR fisicamente separati. Utilizzare sempre reagenti nuovi e RNA estratto e conservato correttamente. Per i dettagli su qualità e integrità del RNA, si rimanda alla sezione 5.3.1 Preparazione dell'RNA totale delle IFU.
- Per eseguire l'esperimento, usare pipette calibrate correttamente e attrezzature di laboratorio adeguate.
- Non mischiare reagenti con numeri di lotto diversi
- La dimensione massima dello studio che può essere caricata per questo prodotto è di 75 Gb. La pipeline analitica può elaborare singoli campioni con un massimo di 1 Gb di dati. Volumi più elevati per campione potrebbero causare il malfunzionamento della pipeline.
- Per le istruzioni dettagliate sul software, consultare il manuale utente della modalità SOPHiA DDM™ Dx.

9.2. Precauzioni generali

- Da utilizzare solo con SOPHiA GENETICS™ Dx RNA Library Prep Kit IV.
- Per uso IVD solo con la modalità SOPHiA DDM™ Dx.
- Non utilizzare kit, reagenti o articoli monouso oltre la data di scadenza.
- Tutti i materiali biologici e le sostanze chimiche sono potenzialmente pericolosi. Anche se è improbabile che il materiale dei campioni FFPE e gli acidi nucleici da essi preparati rappresentino un rischio infettivo, l'utente deve sempre attenersi alle procedure locali in materia di salute e sicurezza.
- I campioni devono essere trattati come infettivi utilizzando procedure di laboratorio sicure come quelle delineate nel documento CLSI M29-A4⁵.
- Conservare e maneggiare i reagenti secondo le istruzioni riportate sulle scatole dei kit e non utilizzarli se scaduti.
- Alcuni reagenti possono richiedere precauzioni di sicurezza. Per informazioni specifiche sulla sicurezza, consultare le schede di sicurezza dei materiali (MSDS) corrispondenti a ciascun componente del prodotto.



- Smaltire i reagenti inutilizzati, i kit, i relativi accessori e i rifiuti in conformità alle normative locali.
- 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 esempio, campioni di input al di fuori dell'intervallo dei criteri raccomandati): Quantità di RNA, contenuto tumorale e DV200) potrebbero portare a risultati compromessi per quanto riguarda le prestazioni analitiche del test. SOPHiA GENETICS™ non è responsabile dei risultati e delle decisioni prese sulla base di questi risultati.
- Si raccomanda di conservare l'RNA purificato in una soluzione tampone composta da 10 mM Tris a pH 7,5 o 8,0 e 0,1 mM EDTA.

9.3. LIMITAZIONI GENERALI

- Il multiplexing per ottenere un numero medio di letture per campione in uno studio inferiore a 3 milioni di letture (1,5 milioni di frammenti) può avere un impatto negativo sulle prestazioni del prodotto.
- L'assenza di un evento di fusione/exon skipping nel referto non esclude la presenza di tale evento al di sotto dei limiti di rilevamento del test. Per ulteriori dettagli sul limite di rilevamento, consultare la sezione 9.3.1.
- La quantità massima di dati per file fastq.gz (o per quattro serie di file nel caso di input a canali separati) è limitata a 200 MB, che corrispondono a 4,5-5 milioni di letture per campione. I file più grandi vengono sottoposti a sottocampionamento (cioè, le letture vengono emesse fino a quando non viene raggiunta la dimensione massima o la fine del file).
- Il prodotto non rileva né segnala eventi di contaminazione incrociata dei campioni.
- Il prodotto non misura né riporta il contenuto di tumore del campione.
- Anche quando si seguono le raccomandazioni per il multiplexing dei campioni e si raggiunge il numero medio raccomandato di 1,5 milioni di coppie di letture per campione per un determinato sequenziamento, la profondità della molecola può essere insufficiente a fornire risultati sensibili e accurati per vari motivi, tra cui: scarsa qualità del campione e dati NGS inadeguati.
- Qualità, numero non uniforme di trascritti mirati tra i campioni raggruppati, allocazione significativamente non uniforme delle letture tra librerie individuali o raggruppate e catturate, allocazione significativamente non uniforme delle letture tra i campioni multiplexati nello stesso studio, allocazione non uniforme della profondità di lettura nel pannello genico (ad esempio, profondità di lettura costantemente inferiore nelle regioni ad alta concentrazione di AT). È anche possibile che le librerie derivate da campioni di scarsa qualità consumino un numero di letture significativamente inferiore al numero medio di letture in uno stesso studio.
- Le analisi sono in grado di rilevare le fusioni geniche, definite come trascrizioni anomale contenenti gli esoni di due geni altrimenti separati, e in particolare le giunzioni esone-esone del gene di fusione a livello di mRNA, a condizione che l'esone del target primario che partecipa alla fusione sia incluso nell'elenco dei target della tabella 4.
- Il Report IVD SOPHiA DDM™ Dx ROS presenta il simbolo del gene, l'ID della trascrizione e gli esoni rilevanti solo per le fusioni che coinvolgono i geni elencati nella tabella 1.
- Tutte le fusioni saranno registrate a condizione che soddisfino le restrizioni elencate nella sezione 7.4.1 Fusione genica + Modulo di chiamata evento di exon-skipping – Filtraggio e segnalazione delle fusioni e degli exon-skipping. Eventuali fusioni che non rientrano nel campo di applicazione di questo prodotto non verranno segnalate.
- Qualsiasi evento di exon-skipping diverso dall'esone 14 di MET e da EGFRVIII non sarà riportato.



- Le prestazioni di rilevamento degli eventi di fusione/exon-skipping sono garantite finché la qualità dei dati è sufficiente, come indicato dall'indicatore di qualità (sezione 7.4.2). L'assenza di eventi segnalati per i campioni con uno stato di qualità WARNING non ne esclude la presenza. Per questi campioni vengono ancora riportate fusioni ad alta affidabilità.
- La frammentazione del materiale in ingresso potrebbe non riflettere l'entità del danno chimico dell'RNA genomico. È noto che i danni chimici diminuiscono la conversione dell'RNA in cDNA e determinano una bassa diversità delle molecole. Pertanto, in alcuni casi, si può ottenere una scarsa qualità dei dati per i campioni con valori di DV200 relativamente elevati (fare riferimento alla sezione 5.2.1).
- Prestazioni compromesse del test, in particolare risultati falsi negativi o inconsistenti, possono essere causate da: problemi nella preparazione del campione o nelle fasi di sequenziamento, presenza di eventi al di sotto del limite di rilevamento, materiale di partenza insufficiente (ad es. <50 ng), bassa qualità del materiale in ingresso, basso contenuto di tumori, profondità di sequenziamento insufficiente, contaminazione con DNA (in particolare con un rapporto DNA:RNA pari o superiore a 4:1), eventi con elevata omologia di sequenza con regioni non target, eventi con bassa complessità di sequenza o limitazioni nella progettazione del kit.
- La bassa diversità molecolare osservata nei dati ottenuti si riflette tipicamente in una bassa resa delle librerie e può essere causata da vari fattori, tra cui materiale in ingresso insufficiente, elevata frammentazione del materiale in ingresso, eccessivo danneggiamento chimico dell'RNA, contaminazione con RNasi, presenza di interferenti chimici, problemi durante la preparazione o l'acquisizione delle librerie, problemi di sequenziamento, profondità di sequenziamento insufficiente. Le indicazioni di scarsa qualità dei dati possono essere osservate come:
 - Bassa resa della libreria – i campioni con una concentrazione della libreria di almeno 25 ng/ml in genere producono dati di qualità sufficiente, misurata dal conteggio delle molecole del gene di controllo; valori inferiori potrebbero indicare problemi di qualità del campione o problemi tecnici.
 - Bassa resa della libreria catturata – le rese di cattura con una concentrazione di almeno 10 ng/ml indicano generalmente una corretta esecuzione del flusso di lavoro.
 - Basso numero di letture – un numero di letture significativamente inferiore a 3M per campione può avere un impatto negativo sulle prestazioni.
 - Problemi di sequenziamento – i parametri di esecuzione del sequenziamento inferiori ai valori raccomandati da Illumina® non consentono di ottenere buone prestazioni del prodotto.
- Gli eventi di fusione e di exon skipping richiedono una quantità sufficiente di molecole di partenza per la fusione nel campione. Gli eventi possono non essere rilevati quando la fusione è poco o per nulla espressa. Il prodotto è in grado di rilevare fusioni/eventi di exon skipping solo se sono espressi a un certo livello in un dato campione, con un numero sufficiente di molecole disponibili per la conversione. I limiti di rilevamento per gli eventi testati sono riportati nella tabella 5 di seguito.

Tabella 5. Limite di rilevamento delle fusioni geniche/eventi di exon-skipping (conta delle molecole)

Obiettivo principale	5' gene	3' gene	5' esone	3' esone	Limite di rilevamento [molecole]*
ALK	EML4	ALK	13	20	303
EGFR	EGFR	EGFR	1	8	258
FGFR3	FGFR3	TACC3	17	11	69
FGFR3	FGFR3	BAIAP2L1	17	2	280



Obiettivo principale	5' gene	3' gene	5' esone	3' esone	Limite di rilevamento [molecole]*
MET	MET	MET	13	15	240
NRG1	CD74	NRG1	6	6	357
NTRK1	LMNA	NTRK1	2	11	371
NTRK1	TFG	NTRK1	5	10	369
NTRK1	TPM3	NTRK1	8	10	213
NTRK3	ETV6	NTRK3	5	15	296
RET	CCDC6	RET	1	12	335
RET	KIF5B	RET	24	11	78
RET	NCOA4	RET	7	12	241
ROS1	CD74	ROS1	6	34	677
ROS1	SLC34A2	ROS1	4	34	187

* Il limite di rilevamento è stato stimato utilizzando la conta delle molecole di fusione nel materiale in ingresso determinata mediante PCR digitale a goccia o i numeri dichiarati dal produttore del materiale di riferimento utilizzato. Il valore è il limite superiore dell'intervallo di affidabilità stimato al 95%, per LoD che garantisce una sensibilità del 95%, calcolato utilizzando 5 diluizioni seriali con almeno 10 repliche ad ogni diluizione⁶.

- Il rilevamento delle fusioni è stato verificato con campioni clinici che presentano un insieme vario ma limitato di fusioni. Non tutti i campioni analizzati provenivano da tumori polmonari. Per un elenco dettagliato, consultare la tabella 6. A causa del numero potenzialmente elevato di fusioni possibili, non è possibile garantire che il prodotto sia in grado di rilevare efficacemente fusioni non incluse in questo elenco.

Tabella 6. Elenco dei campioni utilizzati per il rilevamento della fusione

Obiettivo principale	5' gene	3' gene	5' esone	3' esone	Campioni testati	Tipo di campione
ALK	EML4	ALK	13	20	3	Cancro del polmone, adenocarcinoma polmonare, campione di riferimento
ALK	EML4	ALK	2	20	1	Adenocarcinoma polmonare
ALK	EML4	ALK	6	20	1	Adenocarcinoma polmonare
ALK	PPFIBP1	ALK	12	20	1	Cancro del polmone
EGFR	EGFR	EGFR	1	8	2	Glioma, campione di riferimento
FGFR1	FGFR1	TACC1	17	5	1	Glioma
FGFR2	FGFR2	RBFOX3	17	5	1	Glioma
FGFR3	FGFR3	TACC3	17	11	5	Tumore del tratto urinario, glioblastoma, glioma, campione di riferimento



Obiettivo principale	5' gene	3' gene	5' esone	3' esone	Campioni testati	Tipo di campione
FGFR3	FGFR3	BAIAP2L1	17	2	1	Campione di riferimento
FGFR3	FGFR3	TACC3	17	8	2	Glioma
FGFR3	FGFR3	AGO3	7	12	1	Glioblastoma
FGFR3	FGFR3	AGO3	8	12	1	Glioblastoma
FGFR3	FGFR3	MYH14	17	24	1	Glioma
FGFR3	FGFR3	MYH14	18	24	1	Glioma
MET	MET	MET	13	15	4	Cancro del polmone, adenocarcinoma polmonare, campione di riferimento
NRG1	CD74	NRG1	6	6	2	Cancro del polmone
NRG1	SLC3A2	NRG1	4	6	1	Cancro del polmone
NRG1	SLC3A2	NRG1	5	6	1	Cancro del polmone
NTRK1	LMNA	NTRK1	2	11	1	Campione di riferimento
NTRK1	TFG	NTRK1	5	10	1	Campione di riferimento
NTRK1	TPM3	NTRK1	8	10	1	Campione di riferimento
NTRK1	NOS1AP	NTRK1	10	10	1	Glioma
NTRK2	UBQLN1	NTRK2	1	14	1	Glioma
NTRK2	UBQLN1	NTRK2	1	16	1	Glioma
NTRK3	ETV6	NTRK3	5	15	1	Campione di riferimento
RET	CCDC6	RET	1	12	1	Campione di riferimento
RET	KIF5B	RET	24	11	1	Campione di riferimento
RET	NCOA4	RET	7	12	1	Campione di riferimento
RET	KIF5B	RET	15	12	1	Cancro del polmone
ROS1	CD74	ROS1	6	34	2	Adenocarcinoma polmonare, campione di riferimento
ROS1	SDC4	ROS1	5	34	3	Cancro del polmone
ROS1	GOPC	ROS1	8	35	2	Glioblastoma
ROS1	GOPC	ROS1	8	36	2	Glioblastoma
ROS1	SDC4	ROS1	5	33	2	Cancro del polmone
ROS1	SLC34A2	ROS1	4	34	1	Campione di riferimento
ROS1	CD74	ROS1	6	33	1	Adenocarcinoma polmonare
ROS1	CD74	ROS1	6	35	1	Adenocarcinoma polmonare
ROS1	CD74	ROS1	6	36	1	Adenocarcinoma polmonare



Obiettivo principale	5' gene	3' gene	5' esone	3' esone	Campioni testati	Tipo di campione
ROS1	CD74	ROS1	6	43	1	Adenocarcinoma polmonare
ROS1	SDC4	ROS1	4	34	1	Cancro del polmone
ROS1	TPM3	ROS1	8	35	1	Cancro del polmone

- L'algoritmo di chiamata di fusione è stato testato con letture di sequenziamento generate in silico corrispondenti a fusioni geniche, per un elenco limitato di fusioni (Tabella 7). A causa del numero potenzialmente elevato di fusioni possibili, non è possibile garantire che il prodotto sia in grado di segnalare correttamente le fusioni non incluse in questo elenco. A ciascuna fusione è stata assegnata la probabilità di essere rilevata:
 - High (Alta): più del 90% delle letture simulate sono assegnate alla fusione dal chiamante della fusione.
 - Medium (Media): tra il 60 e il 90% delle letture simulate sono assegnate alla fusione dal chiamante della fusione.
 - Low (Bassa): meno del 60% delle letture simulate sono assegnate alla fusione dal chiamante della fusione.

La mancata assegnazione del 100% delle letture alla fusione prevista si osserva in situazioni in cui non è stato possibile mappare con successo tutte le letture al confine esone-introne. Le ragioni identificate per una mappatura non riuscita includono la bassa complessità della sequenza, la presenza di lunghe regioni omopolimeriche, la presenza di regioni ripetitive e di sequenze con elevata omologia con regioni non bersaglio.

Tabella 7. Probabilità di rilevamento della fusione genica

Obiettivo principale	5' gene	3' gene	5' esone	3' esone	5' trascritto	3' trascritto	Probabilità di rilevabilità
ALK	ATIC	ALK	7	20	NM_004044	NM_004304	High
RET	CCDC6	RET	8	11	NM_005436	NM_020630	High
ALK	SEC31A	ALK	22	20	NM_001077207	NM_004304	High
ALK	TFG	ALK	5	20	NM_001007565	NM_004304	High
ALK	TPM3	ALK	10	20	NM_152263	NM_004304	High
RET	CCDC6	RET	8	12	NM_005436	NM_020630	High
ALK	TPR	ALK	15	20	NM_003292	NM_004304	High
FGFR1	TRIM24	FGFR1	11	9	NM_003852	NM_00117406	High
NTRK2	TRIM24	NTRK2	12	12	NM_003852	NM_00101806	High
RET	TRIM24	RET	9	12	NM_015905	NM_020630	High
NRG1	CD74	NRG1	6	4	NM_001025159	NM_00115999	High
RET	TRIM33	RET	11	12	NM_015906	NM_020630	High



Obiettivo principale	5' gene	3' gene	5' esone	3' esone	5' trascritto	3' trascritto	Probabilità di rilevabilità
RET	TRIM33	RET	16	12	NM_015906	NM_020630	High
RET	TRIM33	RET	17	11	NM_015906	NM_020630	High
ALK	VCL	ALK	13	20	NM_003373	NM_004304	High
ALK	VCL	ALK	16	20	NM_003373	NM_004304	High
ALK	VCL	ALK	6	20	NM_003373	NM_004304	High
FGFR1	ZMYM2	FGFR1	17	10	NM_001190964	NM_00117406	High
ROS1	CLIP1	ROS1	20	36	NM_001247997	NM_002944	High
ALK	CLTC	ALK	30	20	NM_001288653	NM_004304	High
ALK	CLTC	ALK	31	20	NM_001288653	NM_004304	High
ROS1	CLTC	ROS1	31	35	NM_001288653	NM_002944	High
FGFR1	CNTRL	FGFR1	37	8	NM_007018	NM_00117406	High
FGFR1	BCR	FGFR1	4	10	NM_004327	NM_00117406	High
ALK	DCTN1	ALK	13	20	NM_001135040	NM_004304	High
ALK	EML4	ALK	1	20	NM_001145076	NM_004304	High
ALK	EML4	ALK	12	20	NM_001145076	NM_004304	High
ALK	EML4	ALK	13	20	NM_001145076	NM_004304	High
ALK	EML4	ALK	14	20	NM_001145076	NM_004304	High
ALK	EML4	ALK	16	20	NM_001145076	NM_004304	High
ALK	EML4	ALK	17	20	NM_001145076	NM_004304	High
ALK	EML4	ALK	2	20	NM_001145076	NM_004304	High
FGFR1	BCR	FGFR1	4	8	NM_004327	NM_00117406	High
ALK	EML4	ALK	19	18	NM_001145076	NM_004304	High



Obiettivo principale	5' gene	3' gene	5' esone	3' esone	5' trascritto	3' trascritto	Probabilità di rilevabilità
ALK	EML4	ALK	19	20	NM_001145076	NM_004304	High
ALK	EML4	ALK	3	20	NM_001145076	NM_004304	High
NTRK3	EML4	NTRK3	1	14	NM_001145076	NM_00100715	High
RET	ERC1	RET	10	12	NM_001301248	NM_020630	High
RET	ERC1	RET	12	12	NM_001301248	NM_020630	High
RET	ERC1	RET	17	12	NM_001301248	NM_020630	High
RET	ERC1	RET	7	12	NM_001301248	NM_020630	High
ROS1	ERC1	ROS1	10	36	NM_001301248	NM_002944	High
ROS1	ERC1	ROS1	11	36	NM_001301248	NM_002944	High
FGFR3	ETV6	FGFR3	5	10	NM_001987	NM_000142	High
NTRK3	ETV6	NTRK3	3	14	NM_001987	NM_00100715	High
NTRK3	ETV6	NTRK3	4	14	NM_001987	NM_00100715	High
NTRK3	ETV6	NTRK3	4	15	NM_001987	NM_00101233	High
NTRK3	ETV6	NTRK3	5	15	NM_001987	NM_00101233	High
NTRK3	ETV6	NTRK3	5	20	NM_001987	NM_00101233	High
RET	ETV6	RET	5	12	NM_001987	NM_020630	High
FGFR1	FGFR1	PLAG1	1	2	NM_001174063	NM_002655	High
FGFR1	FGFR1	PLAG1	1	4	NM_001174063	NM_00111463	High
ALK	CARS	ALK	17	20	NM_001014437	NM_004304	High
NTRK2	FRMD3	NTRK2	1	12	NM_001244959	NM_00101806	High
RET	GOLGA5	RET	7	12	NM_005113	NM_020630	High
ROS1	GOPC	ROS1	3	36	NM_001017408	NM_002944	High



Obiettivo principale	5' gene	3' gene	5' esone	3' esone	5' trascritto	3' trascritto	Probabilità di rilevabilità
ROS1	GOPC	ROS1	4	36	NM_001017408	NM_002944	High
ROS1	GOPC	ROS1	7	35	NM_001017408	NM_002944	High
ALK	HIP1	ALK	21	20	NM_001243198	NM_004304	High
ALK	HIP1	ALK	26	20	NM_001243198	NM_004304	High
ALK	HIP1	ALK	28	20	NM_001243198	NM_004304	High
RET	HOOK3	RET	11	12	NM_032410	NM_020630	High
ALK	CARS	ALK	18	20	NM_001014437	NM_004304	High
ALK	KIF5B	ALK	15	20	NM_004521	NM_004304	High
ALK	KIF5B	ALK	17	20	NM_004521	NM_004304	High
RET	KIF5B	RET	1	11	NM_004521	NM_020630	High
RET	KIF5B	RET	14	12	NM_004521	NM_020630	High
RET	KIF5B	RET	15	11	NM_004521	NM_020630	High
RET	KIF5B	RET	15	12	NM_004521	NM_020630	High
RET	KIF5B	RET	16	12	NM_004521	NM_020630	High
RET	KIF5B	RET	22	12	NM_004521	NM_020630	High
RET	CCDC6	RET	1	11	NM_005436	NM_020630	High
RET	KIF5B	RET	23	12	NM_004521	NM_020630	High
RET	KIF5B	RET	24	11	NM_004521	NM_020630	High
FGFR2	KLK2	FGFR2	1	5	NM_001002231	NM_000141	High
FGFR2	KLK2	FGFR2	3	5	NM_001002231	NM_000141	High
RET	KTN1	RET	29	12	NM_001079521	NM_020630	High
ROS1	LRIG3	ROS1	16	35	NM_001136051	NM_002944	High
ALK	MSN	ALK	11	20	NM_002444	NM_004304	High
RET	NCOA4	RET	6	12	NM_001145260	NM_020630	High



Obiettivo principale	5' gene	3' gene	5' esone	3' esone	5' trascritto	3' trascritto	Probabilità di rilevabilità
RET	NCOA4	RET	7	12	NM_001145260	NM_020630	High
RET	CCDC6	RET	1	12	NM_005436	NM_020630	High
FGFR4	NSD1	FGFR4	2	7	NM_022455	NM_00129198	High
RET	PCM1	RET	29	12	NM_001315507	NM_020630	High
RET	PCM1	RET	31	17	NM_001315507	NM_020630	High
ALK	PPFIBP1	ALK	12	20	NM_003622	NM_004304	High
ALK	PPFIBP1	ALK	6	20	NM_001198915	NM_004304	High
ROS1	PPFIBP1	ROS1	6	35	NM_001198915	NM_002944	High
RET	CCDC6	RET	2	12	NM_005436	NM_020630	High
ROS1	PWWP2A	ROS1	1	36	NM_001130864	NM_002944	High
NTRK2	QKI	NTRK2	6	12	NM_001301085	NM_00101806	High
ALK	RNF213	ALK	20	20	NM_001256071	NM_004304	High
ROS1	SDC4	ROS1	2	35	NM_002999	NM_002944	High
ALK	SEC31A	ALK	20	20	NM_001077206	NM_004304	High
ALK	TFG	ALK	4	20	NM_001007565	NM_004304	High
RET	NCOA4	RET	8	11	NM_001145260	NM_020630	High
RET	NCOA4	RET	8	12	NM_001145260	NM_020630	High
ROS1	TFG	ROS1	4	35	NM_001007565	NM_002944	High
ALK	MSN	ALK	10	20	NM_002444	NM_004304	Medium
ALK	TPM3	ALK	6	20	NM_001043351	NM_004304	Medium
ROS1	PPFIBP1	ROS1	8	35	NM_001198915	NM_002944	Medium
ALK	STRN	ALK	3	20	NM_003162	NM_004304	Medium



Obiettivo principale	5' gene	3' gene	5' esone	3' esone	5' trascritto	3' trascritto	Probabilità di rilevabilità
NTRK1	TPM3	NTRK1	7	12	NM_001043351	NM_00100779	Medium
ROS1	TPM3	ROS1	7	35	NM_001043351	NM_002944	Medium
NRG1	CD74	NRG1	5	4	NM_001025158	NM_00115999	Low
ALK	CLIP1	ALK	12	20	NM_001247997	NM_004304	Low
ALK	EML4	ALK	20	20	NM_001145076	NM_004304	Low
RET	BCR	RET	3	12	NM_004327	NM_020630	Low
NRG1	SDC4	NRG1	4	4	NM_002999	NM_00115999	Low
ROS1	TFG	ROS1	3	35	NM_001007565	NM_002944	Low
FGFR1	CNTRL	FGFR1	38	10	NM_007018	NM_00117406	Low
ALK	KIF5B	ALK	24	20	NM_004521	NM_004304	Low
RET	PRKAR1A	RET	8	12	NM_001276289	NM_020630	Low
RET	KIF5B	RET	1	12	NM_004521	NM_020630	Low
ALK	TPM3	ALK	4	20	NM_001043351	NM_004304	Low
ALK	DCTN1	ALK	23	20	NM_001135040	NM_004304	Low
ALK	STRN	ALK	2	20	NM_003162	NM_004304	Low
NTRK1	TPM4	NTRK1	8	12	NM_001145160	NM_00100779	Low
ROS1	TPM3	ROS1	3	36	NM_001043351	NM_002944	Low
ALK	TPM4	ALK	8	20	NM_001145160	NM_004304	Low
ALK	RANBP2	ALK	18	20	NM_006267	NM_004304	Low

- Il rilevamento delle seguenti fusioni non è supportato dal prodotto a causa di problemi di mappatura delle giunzioni di fusione.



5' gene	3' gene	5' esone	3' esone
TRIM27	RET	3	12
NPM1	ALK	5	20
RANBP2	FGFR1	19	8

- Le fusioni in cui il punto di rottura si trova nel corpo di un esone possono essere rilevate, ma richiedono un supporto molecolare aggiuntivo rispetto alle fusioni con punti di rottura intronici (>10 molecole di supporto).
- La rilevazione di fusioni FGFR4 non è stata convalidata in campioni clinici di RNA FFPE a causa della rarità di tali eventi. La possibilità di rilevare fusioni di FGFR4 si basa su quanto segue:
 - È stato osservato che gli esoni FGFR4 mirati presentano una copertura molecolare relativamente elevata in una serie di campioni clinici, a sostegno della capacità del prodotto di catturare eventuali trascritti di fusione FGFR4 che coinvolgono questi esoni.
 - La rilevazione di una fusione FGFR4 clinicamente rilevante è stata verificata in silico (vedi sopra) per confermare che la quantità limitata di dati a sostegno del riarrangiamento in questo target viene riconosciuta correttamente dalla pipeline analitica SOPHiA DDM™ Dx ROS.
 - La capacità di rilevare eventi di fusione multipli dei geni omologhi FGFR1, FGFR2 e FGFR3 è stata confermata sia in campioni clinici che in silico.
- Gli eventi nelle regioni per le quali il frammento di RNA pertinente non viene raccolto dalle sonde non possono essere rilevati dal prodotto. La cattura delle trascrizioni può essere limitata da:
 - INDEL che influenzano l'ibridazione delle sonde. Questo può portare all'assenza di rilevazione o a una stima errata del conteggio delle molecole.
 - La presenza di mutazioni aggiuntive nella regione target della sonda.
- Le singole molecole di RNA vengono discriminate dall'algoritmo in base alle coordinate di inizio delle letture di sequenziamento allineate; può accadere che più molecole distinte producano letture con coordinate di inizio identiche e vengano considerate come una singola molecola. In questi casi, il numero di molecole rilevate sarà sottostimato.
- IGH è un partner di fusione clinicamente rilevante per i geni IVD definiti da COSMIC e le fusioni che coinvolgono questo gene sono riportate con le coordinate genomiche. Questo gene è estremamente polimorfo e considerato un "locus multi-gene", senza un trascritto RefSeq assegnato ad esso. Poiché non esiste un trascritto univoco assegnato a questo gene, gli eventi di fusione che lo includono non possono essere annotati correttamente.
- Le fusioni readthrough che si verificano quando due geni adiacenti vengono sottoposti a splicing non vengono segnalate se la distanza delle regioni di splicing è inferiore a 100 kb (vedere Filtraggio e segnalazione di fusioni ed exon skipping).
- In rari casi, la qualità del campione può essere stimata erroneamente per i campioni con espressione atipicamente alta o bassa del gene di controllo.
- La presenza di una quantità estremamente elevata di un particolare trascritto target del test può diminuire la copertura molecolare dei target rimanenti e, di conseguenza, ridurre le prestazioni del test. Per valutare questo scenario, fare riferimento all'Allegato I: diagramma di copertura nel report QA.



10. RIFERIMENTI

1. Schram AM, Chang MT, Jonsson P, Drilon A. Fusions in solid tumours: diagnostic strategies, targeted therapy, and acquired resistance. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(12):735-748.
2. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, et al. COSMIC: The Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D941-D947.
3. Jang YE, Jang I, Kim S, et al. ChimerDB 4.0: an updated and expanded database of fusion genes. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D817-D824.
4. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15-21.
5. CLSI. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections- Approved Guideline*. Clinical & Laboratory Standards Institute; 2005. Terza edizione.
6. Odegaard JI, Vincent JJ, Mortimer S, et al. Validation of a plasma-based comprehensive cancer genotyping assay utilizing orthogonal tissue- and plasma-based methodologies. *Clin Cancer Res*. 2018;24(15):3539-3549.



11. 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
	Contiene un numero sufficiente per <n> test
	Importatore
	Consultare il paragrafo Avvertenze e precauzioni nella sezione 5.
	Consultare il paragrafo Avvertenze e precauzioni nella sezione 5.
	Consultare il paragrafo Avvertenze e precauzioni nella sezione 5.
	Consultare il paragrafo Avvertenze e precauzioni nella sezione 5.
	Consultare il paragrafo Avvertenze e precauzioni nella sezione 5.
	Box 1
	Box 2



12. SUPPORTO

In caso di difficoltà nell'utilizzo di SOPHiA DDM™, consultare la sezione "Risoluzione dei problemi" del manuale d'uso della modalità SOPHiA DDM™ Dx o contattare il nostro servizio di assistenza telefonica al numero +41 21 694 10 60 o via 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 di SOPHiA DDM™.

Qualsiasi incidente grave che si verifichi in relazione al dispositivo deve essere prontamente segnalato a SOPHiA GENETICS e alle autorità competenti dello Stato membro in cui si trova l'utente e/o il paziente.

Non utilizzare componenti danneggiati. Contattare support@sophiagenetics.com in caso di dubbi sui kit.



13 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Tabella 8. Raccomandazioni in caso di stato di qualità "WARNING" nel report SOPHiA DDM™ Dx ROS IVD per un campione a causa di una copertura insufficiente (<50 volte) del gene di controllo.

CAUSA PRINCIPALE	COME IDENTIFICARE LA CAUSA PRINCIPALE	RACCOMANDAZIONI PER LA MITIGAZIONE
Quantità insufficiente di RNA di input	- Rendimento totale della libreria <25 ng/ml - Rendimento della libreria di cattura <10 ng/ml	Utilizzando un metodo di quantificazione fluorimetrica, convalidare l'utilizzo di una quantità minima di 50 ng di RNA totale per campione.
Basso tasso di conversione della libreria (tasso di conversione dell'RNA di input in molecole compatibili con il sequenziamento)	- Rendimento totale della libreria <25 ng/ml - Rendimento della libreria di cattura <10 ng/ml	- Assicurarsi che l'RNA di input sia privo di sostanze che inibiscono l'attività enzimatica, seguendo le raccomandazioni sulla composizione del tampone di conservazione definite nella Sezione 5.2.1. - Assicurarsi che l'RNA non sia eccessivamente frammentato (ad esempio, a causa della contaminazione con RNasi) prima o durante l'esecuzione del protocollo, aderendo alle soglie minime di integrità dell'RNA e alle migliori pratiche di manipolazione dell'RNA definite nella sezione 5.2.1. - Ridurre al minimo il rischio di modifica chimica dell'RNA di input utilizzando i protocolli di deparaffinizzazione istologica standard, come raccomandato nella Sezione 5.2.1. Se necessario, ridurre la durata della fissazione con formalina.
Scarso bilanciamento dei campioni multiplexati sulla stessa corsa di sequenziamento, con il risultato di <3 M letture per campione	Nel report di controllo della qualità, controllare il numero di letture tra i campioni sequenziati nello stesso studio e verificare se la distribuzione delle letture è bilanciata o se esistono campioni anomali che presentano conteggi di letture significativamente più alti o più bassi rispetto alla media.	Se si osserva uno squilibrio significativo nel numero di letture tra i campioni, ripetere la quantificazione e il raggruppamento delle librerie dei singoli campioni per assicurarsi che abbiano la stessa molarità prima di ripetere la corsa di sequenziamento.
Scarsa resa dei dati della corsa di sequenziamento, con un risultato di <3 M letture per campione	Nel report di controllo della qualità, controllare il numero totale di letture prodotte dal sequenziamento. Confrontare questo dato con il numero di letture previsto definito dal produttore (Illumina®): ~260 M letture paired-end per i kit Mid-Output ~800 M letture paired-end per i kit High-Output (solo CDS)	- Verificare che le metriche relative al sequenziamento (ad es. densità dei cluster grezzi, filtro di superamento dei cluster, percentuale di allineamento e distribuzione Q30) rientrino negli intervalli normali per identificare potenziali problemi tecnici con il sequenziatore o i materiali di consumo utilizzati per il sequenziamento e, se necessario, contattare l'assistenza tecnica del produttore (Illumina®). - Ripetere il sequenziamento regolando la concentrazione finale di caricamento della libreria insufficiente o eccessivo.



14. APPENDICE II-PIASTRE PRIMER PER DOPPIO INDICE UNIVOCO

32 primer per doppio indice univoco V2 compatibili con Illumina® in formato piastra a 96 pozzetti (7 µl ciascuno)

	1	2	3	4	5	6	7	...	12
A	sgUDI-49	sgUDI-57	sgUDI-65	sgUDI-73					
B	sgUDI-50	sgUDI-58	sgUDI-66	sgUDI-74					
C	sgUDI-51	sgUDI-59	sgUDI-67	sgUDI-75					
D	sgUDI-52	sgUDI-60	sgUDI-68	sgUDI-76					
E	sgUDI-53	sgUDI-61	sgUDI-69	sgUDI-77					
F	sgUDI-54	sgUDI-62	sgUDI-70	sgUDI-78					
G	sgUDI-55	sgUDI-63	sgUDI-71	sgUDI-79					
H	sgUDI-56	sgUDI-64	sgUDI-72	sgUDI-80					

Sequenze di indice per i primer per doppio indice univoco compatibili con Illumina®.

Indice	Sequenze i5 per foglio campione MiSeq	Sequenze i5 per foglio campione NextSeq	i7
sgUDI-49	GCTCACTG	CAGTGAGC	ACCAAGGA
sgUDI-50	CAGGATTG	CAATCCTG	CAGACCTG
sgUDI-51	GTCTAGTT	AACTAGAC	CGAGCAAC
sgUDI-52	TGAATGGC	GCCATTCA	TCTTGACT
sgUDI-53	ACGACAAT	ATTGTCGT	GACAATGG
sgUDI-54	GAACGCCA	TGGCGTTC	GTTCTACG
sgUDI-55	CTGTCCTG	CAGGACAG	AACGCTGC
sgUDI-56	ATAAGGAC	GTCCTTAT	GGACATCA
sgUDI-57	TACATTCC	GGAATGTA	TTGAGCTC
sgUDI-58	GGTTAGCT	AGCTAACC	ACGTTGAG
sgUDI-59	CCTGCTGA	TCAGCAGG	CTTCAGGA
sgUDI-60	CCTCAATC	GATTGAGG	TGCCAACT
sgUDI-61	CGAAGAAT	ATTCTTCG	AGGTCATG
sgUDI-62	TAGTCGAG	CTCGACTA	TACTAGCA
sgUDI-63	ATCCTCAC	GTGAGGAT	GTAAGTGT
sgUDI-64	GCTGCAGT	ACTGCAGC	TGAGTTGA



Indice	Sequenze i5 per foglio campione MiSeq	Sequenze i5 per foglio campione NextSeq	i7
sgUDI-65	GGCAATCG	CGATTGCC	CCTTAGAC
sgUDI-66	GCATCTTA	TAAGATGC	TATCGCCA
sgUDI-67	GTGCTGAA	TTCAGCAC	GCAGAACA
sgUDI-68	ATTGACGC	GCGTCAAT	AGGAATGC
sgUDI-69	GCCGCATT	AATGCGGC	CGTGAGGT
sgUDI-70	TGTAGTCA	TGACTACA	CAATTCAG
sgUDI-71	TCCTCCGA	TCGGAGGA	GGTCCTTC
sgUDI-72	CAATCGAG	CTCGATTG	TTCCGGCA
sgUDI-73	TAAGTCCG	CGGACTTA	ATGCCTGA
sgUDI-74	GGACAGTT	AACTGTCC	TCCAGGAC
sgUDI-75	TTGAGTGA	TCACTCAA	GCTGTCAC
sgUDI-76	CGTAACAT	ATGTTACG	CGACGATT
sgUDI-77	TACGCAGT	ACTGCGTA	TCGCAACG
sgUDI-78	ACCTGACC	GGTCAGGT	GAGTTGTA
sgUDI-79	CCACCTGA	TCAGGTGG	CGCTAAGG
sgUDI-80	TCACCGTG	CACGGTGA	TTGCGTGC



Document Approvals
Approved Date: 28 Jan 2026

Approval Verdict: Approve	Coleman Spence, (cspence@sophiagenetics.com) Regulatory Approval 28-Jan-2026 01:12:11 GMT+0000
QA Approval Verdict: Approve	Claire Mullane, (cmullane@sophiagenetics.com) Quality Assurance Approval 28-Jan-2026 08:59:10 GMT+0000