ISTRUZIONI PER L'USO

16, 32, 48 E 96 CAMPIONI

SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution

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

SOPHiA GENETICS™

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

SINTESI DELLE INFORMAZIONI

Nome prodotto	SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution
Tipo di prodotto	Soluzione bundle
Famiglia di prodotti	Applicazione di diagnostica molecolare (kit + analisi)
ID algoritmo	ILL1XG1S9_CNV
ID pannello geni	MYS_v1
Versione del prodotto	1.0
Tipo di campione	DNA somatico isolato dal sangue
Sequenziatore	Illumina - MiSeq
Descrizione GMDN	Kit di reagenti per IVD / Software interpretativo di analisi genomica umana
ID documento	SG-00682
Versione del documento	v5.1
Data di revisione	9 gennaio 2023

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

SOPHiA GENETICS™ SA
ZA La Pièce 12
1180 Rolle
Switzerland

SOPHiA GENETICS™ SAS
Technopole Izarbel
374 Allée Antoine d'Abbadie
64210 Bidart, France

REF

BS0103ILLCSML01-016
BS0103ILLCSML01-032
BS0103ILLCSML01-048
BS0103ILLCSML01-96

EC REP

CE IVD

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

CODICI DEI PRODOTTI

	CODICE PRODOTTO COMPLETO	BOX 1	BOX 2	KIT PREPARAZIONE LIBRERIA
REF	BS0103ILLCSML01-016	B1.01.0003.C-16	B2.0003.C-16	700232
	BS0103ILLCSML01-032	B1.01.0003.C-32	B2.0003.C-32	700232
	BS0103ILLCSML01-048	B1.01.0003.C-48	B2.0003.C-48	700234
	BS0103ILLCSML01-96	B1.01.0003.C-96	B2.0003.C-48	700234

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

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 (COMPRESE PARTI DI ESSO O IL RELATIVO SOFTWARE).

MARCHI COMMERCIALI

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

xGen® e Lockdown® sono marchi registrati di Integrated DNA Technologies, Inc.

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

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

KAPA™ è un marchio commerciale di Roche.

QIAseq® è un marchio registrato di Qiagen.

SOPHiA GENETICS™ e SOPHiA DDM™ Dx sono marchi commerciali di SOPHiA GENETICS™ SA e/o delle sue affiliarte negli USA e 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.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

ID DOCUMENTO/VERSIONE	DATA	DESCRIZIONE DELLA MODIFICA
SG-00682 - 5.1	9 gen. 23	• Correzione degli errori di formattazione
SG-00682 - 5.0	14 set 22	• Aggiunta del simbolo del marchio commerciale SOPHiA DDM e SOPHiA GENETICS. • Nome del kit preparazione libreria modificato in SOPHiA GENETICS™ Dx ovunque. • Versione del documento aggiornata al numero intero successivo senza decimali.
SG-00682 - 4.5	19 apr. 22	• Aggiunte istruzioni app web SOPHiA DDM™
SG-00682 - 4.4	14 apr. 22	• Limitazioni e avvertenze: modificato • Indirizzo dell'ufficio di SOPHiA GENETICS™ aggiornato • Modifiche Wet Lab come raccomandato globalmente • Piccole modifiche e correzioni di refusi
ID-60101-17 - 4.3	21 lug. 21	• Pagina 2 - ID documento corretto. • Pagine 2, 29 - Modifiche estetiche. • Pagina 17 - Ordine dei passaggi modificato. Pagina 26 - Volume pre-mix PCR "da 48 campioni" corretto.
ID-60101-17 - 4.2	16 giu. 21	• Pagina 3 - Marchio commerciale modificato. • Pagina 44 - Piccola aggiunta nelle specifiche del file. • Pagine 55, 56 - Refuso "Unico" nell'intestazione rimosso.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

ID DOCUMENTO/VERSIONE	DATA	DESCRIZIONE DELLA MODIFICA
ID-60101-17 - 4.1	28 mag. 21	• Pagina 2 - Tabella delle informazioni riepilogative modificata. • Pagina 3 - Esonero da responsabilità modificato. • Pagine 11, 13, 15, 29 - Intestazione della tabella modificata. • Pagina 16 - Passaggi 1 e 2 della sequenza scambiati. • Pagina 17 - Preparazione dell'etanolo spostata in "Preparazione". • Pagine 12, 18, 19, 21, 22, 23, 27, 35, 36, 37, 38, 43 - Modifiche estetiche e refusi. • Pagina 20 - Punto 1, punto elenco 2 - cambiato "Potenziatore FX" in "pre-mix reazione FX Reaction". • Pagina 47 - Punti elenco 2 e 18 aggiunti, punto 19 modificato.
ID-60101-17 - 4.0	30 mar. 21	• Pagina del titolo, logo aziendale, intestazione, piè di pagina, ultima pagina. • Argomenti riorganizzati. • Inclusi installazione, caricamento e istruzioni sulla convenzione di denominazione dell'app web SOPHiA DDM™. • Combinate insieme quattro "Istruzioni per l'uso" in formato kit includendo numeri di campioni diversi. Incluse le tabelle e apportate le opportune modifiche, se e quando necessario. • Sono stati combinati i documenti "Istruzioni per l'uso" dei seguenti kit: PM_CEIVD_B2.1.1.14_r2en PM_CEIVD_B2.1.1.16_r2en PM_CEIVD_B2.1.1.18_r2en PM_CEIVD_B2.1.1.24_r1en • Piccole modifiche per chiarezza nelle sezioni seguenti: • Sezione 5.3.1 Pooling della libreria • Sezione 5.3.5 Lavare le sfere di streptavidina per rimuovere il DNA non legato

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

SOMMARIO

1. Uso/finalità previsti **1**

2. Sintesi e spiegazione del test **2**

3. Dichiarazione generale dei principi di prova / procedurali **5**

4. Componenti del prodotto **6**

5. Materiali e metodi del kit **7**

5.1. Considerazioni iniziali 7

5.1.1. Contenuto del kit (16, 32, 48 o 96 campioni) *7*

5.1.2. Materiale richiesto (non fornito) *14*

5.2. Preparazione libreria 15

5.2.1. Preparazione del FFPE genomico *15*

5.2.2. Preparazione dei pre-mix e dei reagenti *17*

5.2.3. Frammentazione enzimatica, riparazione finale e A-tailing *19*

5.2.4. Legatura *20*

5.2.5. Pulizia post-legatura *22*

5.2.6. Selezione dimensione doppia *23*

5.2.7. Amplificazione della libreria *24*

5.2.8. Pulizia post-amplificazione *26*

5.2.9. Quantificazione individuale della libreria e controllo qualità *27*

5.3. Cattura 28

5.3.1. Pooling della libreria *28*

5.3.2. Ibridazione *29*

5.3.3. Preparazione delle sfere di streptavidina *31*

5.3.4. Legame di target ibridati alle sfere *32*

5.3.5. Lavare le sfere di streptavidina per rimuovere il DNA non legato *33*

5.3.6. Amplificazione post-cattura *35*

5.3.7. Pulizia post-cattura dell'amplificazione *36*

5.3.8. Quantificazione finale della libreria e controllo qualità *37*

5.4. Sequenziamento 37

5.4.1. Preparazione della libreria per il sequenziamento *37*

6. Procedura di analisi **39**

6.1. Istruzioni per l'installazione dell'app web SOPHiA GENETICS™ 39

6.2. Descrizione del flusso di lavoro di analisi per la generazione di risultati IVD 39

7. Limitazioni, avvertenze e precauzioni **40**

8. Valutazione della performance non cliniche **45**

8.1. METODI 45

8.2. DATI 47

8.3. CONCLUSIONI GENERALI 47

8.4. RISULTATI 49

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

9. Simboli 50
10. Supporto 51
Appendice 1. Piastre adattatrici a doppio indice 52
Appendice 2. Attrezzatura di laboratorio usata nel laboratorio di SOPHiA GENETICS™ 55
Appendice 3. Flusso di lavoro generale – SOPHiA DDM™ Capture Solutions 58
Appendice 4. Elenco delle regioni target e regioni applicabili e contrassegnate 60

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

1. USO/FINALITÀ PREVISTI

Il prodotto viene utilizzato per identificare le varianti che si verificano in 30 geni coinvolti nelle neoplasie mieloidi puntando a specifiche posizioni soggette a mutazioni all'interno della sequenza genomica. Il prodotto è stato ideato come ausilio per gli operatori sanitari per prendere una decisione clinica relativa alle neoplasie mieloidi, e per fornire un razionale molecolare per una terapia appropriata.

Il prodotto è destinato esclusivamente all'uso diagnostico in vitro e all'uso professionale.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

2. SINTESI E SPIEGAZIONE DEL TEST

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

LEUCEMIA

La leucemia mieloide acuta (LMA) è la leucemia acuta più comune negli adulti, con circa 20.000 nuovi casi all'anno negli Stati Uniti. La LMA è ancora abbastanza rara in generale, rappresentando solo circa l'1% di tutti i tipi di cancro. La LMA è causata da una regolazione difettosa dei programmi di differenziazione e autorinnovamento delle cellule staminali ematopoietiche multipotenti (CSE), con conseguente espansione nel midollo osseo di precursori mieloidi con capacità differenziativa limitata o anormale, che si diffondono alla periferia. In media, esistono 13 geni mutati per ciascun caso di LMA con i primi geni mutati che sono FLT3, NPM1, DNMT3A, IDH1, IDH2, TET2, RUNX1, TP53, NRAS, CEBPa e WT1. La LMA mutata in NPM1 rappresenta il gruppo di pazienti maggiore, con più del 70% dei pazienti che portano anche mutazioni in altri geni, come DNMT3A, IDH1, IDH2(R140) e TET2. Il secondo gruppo più grande contiene pazienti con mutazioni nei geni che regolano lo splicing dell'RNA (SRSF2, SF3B1, U2AF1, ZRSR), la struttura della cromatina (ASXL1, STAG2, BCOR, MLL-PTD, EZH2, PHF6), o la trascrizione (RUNX1) (Papaemmanuil et al. 2016) Tra le alterazioni della linea germinale figurano le alterazioni della biologia dei telomeri che coinvolgono i geni TERC o TERT, LMA familiare con CEBPa mutato, sindromi mielodisplastiche familiari o LMA familiare (GATA2), e alterazioni piastriniche familiari con propensione alla malignità mieloide.

NEOPLASIE MIELOPROLIFERATIVE (NMP)

Le neoplasie mieloproliferative (NMP) sono caratterizzate da una produzione eccessiva di cellule mieloidi differenziate terminalmente, derivate clonalmente da una singola cellula staminale ematopoietica (HSC) mutata. Le NMP più frequenti comprendono la leucemia mieloide cronica (LMC), la trombocitemia essenziale (TE), la policitemia vera (PV) e la mielofibrosi primaria (MFP). Oltre a queste neoplasie, le NMP includono altre entità rare come la leucemia neutrofila cronica (LNC), la leucemia eosinofila cronica (LEC), le NMP non altrimenti specificate e quelle non classificabili. Queste quattro NMP vengono ulteriormente suddivise in LMC e BCR-ABL1 negativa o

NMP Philadelphia-negative. Nelle NMP, una singola mutazione somatica potrebbe essere associata a diversi fenotipi che includono i geni driver JAK2, CALR, MPL. Al contrario, le mutazioni associate alle NMP Philadelphia-negative non sono specifiche per una singola entità di NMP e quindi non possono essere utilizzate da sole per la diagnosi di NMP. Tuttavia, specifiche mutazioni ricorrenti possono essere riscontrate in una percentuale molto alta di pazienti affetti da NMP in geni come JAK2, CALR o MPL per la trombocitemia essenziale, ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2 o SF3B1 per la mielofibrosi primaria e CSF3R per la leucemia mieloide cronica.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

NEOPLASIE MIELODISPLASTICHE/MIELOPROLIFERATIVE (NMD/NMP)

Le malattie mielodisplastiche/neoplasie mieloproliferative (NMD/NMP) rappresentano una categoria distinta di alterazioni mieloidi che possiedono caratteristiche sia displastiche che proliferative. Queste alterazioni non sono propriamente classificate come NMD o NMP perché presentano alcune caratteristiche sia della NMD che della NMP. Le NMD/NMP condividono con le NMP un'eccessiva produzione di cellule mieloidi e segni di displasia delle cellule mieloidi e/o citopenia con le NMD. La categoria NMD/NMP comprende tre principali disturbi mieloidi: leucemia mielomonocitica cronica (LMMC), leucemia mielomonocitica giovanile (LMMG) e leucemia mieloide cronica atipica (LMCA). La diagnosi a volte può essere difficile, ed è spesso necessaria l'esclusione di altre neoplasie mieloidi croniche.

La maggior parte delle mutazioni identificate nelle NMD/NMP non sono specifiche di una singola entità. Tuttavia, le frequenze con cui i singoli geni sono mutati variano significativamente tra i diversi sottotipi. Le mutazioni SF3B1 sono associate ai criteri dell'NMD; le mutazioni JAK2, CALR e l'MPL con l'NMP; CSF3R con la LNC; qualsiasi evidenza clonale con la LMMC; e mutazioni SETBP1 o ETNK1 con la LMCA.

La seguente tabella mostra i geni che vengono bersagliati da SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution (MYS) e le malattie associate a questi geni.

Tabella 1. Geni bersagliati da SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution (MYS) e le malattie a essi associate

Leucemia	NMP	NMD/NMP
ASXL1	ABL1	ABL1
BRAF	ASXL1	AXSL1
CBL	CALR	CALR
CEBP*a*	CBL	CBL
DNMT3A	DNMT3A	CSF3R
EZH2	ETV6	DNMT3A
FLT3	EZH2	EZH2
HRAS	FLT3	JAK2
IDH1	IDH1	KRAS
IDH2	IDH2	MPL
KIT	JAK2	NRAS
KRAS	MPL	PTPN11
NPM1	NRAS	RUNX1
NRAS	RUNX1	SETBP1
PTPN11	SF3B1	SF3B1

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

Tabella 1. Geni bersagliati da SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution (MYS) e le malattie a essi associate (segue)

Leucemia	NMP	NMD/NMP
RUNX1	SRSF2	SRSF2
SF3B1	TET2	TET2
SRSF2	TP53	ZRSR2
TET2	U2AF1	-
U2AF1	-	-
WT1	-	-
ZRSR2	-	-

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

3. DICHIARAZIONE GENERALE DEI PRINCIPI DI PROVA / PROCEDURALI

La funzione convalidata dell'analisi con SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution (MYS) (SOPHiA DDM™ Dx soluzione mieloide) consiste nell'analizzare i dati NGS grezzi generati da uno strumento Illumina MiSeq® con il kit di reagenti MiSeq® Reagent Kit v3, su campioni somatici isolati dal sangue con KAPA® Library Amplification Kit e Kit preparazione libreria I DNA SOPHiA GENETICS™ (QIAseq® FX DNA Library Kit con licenza OEM di QIAGEN).

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

Per condurre l'analisi, i risultati devono essere caricati sulla piattaforma SOPHiA DDM™ e analizzati utilizzando l'applicazione SOPHiA DDM™ Dx - SOPHiA DDM™ Dx MYS.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

4. COMPONENTI DEL PRODOTTO

La SOPHiA DDM™ Dx MYS è composta da tre componenti principali: il kit NGS, la pipeline bioinformatica e la piattaforma SOPHiA DDM™ per diagnostica IVD.

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

La SOPHiA DDM™ Dx MYS offre anche un componente aggiuntivo tramite l’app per desktop SOPHiA DDM™ che consente di visualizzare, interpretare e inserire in report i risultati del supporto decisionale clinico (CDS) calcolati dalla pipeline bioinformatica. Le funzionalità chiave di CDS supportate dalla piattaforma SOPHiA DDM™ consentono di: visualizzare e interpretare SNV e INDEL da 30 geni e CNV. Le limitazioni associate alle funzioni CDS vengono fornite in una sottosezione della sezione 7 - Limitazioni, avvertenze e precauzioni.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

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 (16, 32, 48 o 96 campioni)

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

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

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

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

- Blocchi universali IDT Blocking Oligo xGen® - TS Mix (12 µl)
- Human Cot DNA (25 µl)
- Myeloid Solution xGen® Lockdown® Probes by SOPHiA GENETICS™ (20 µl)
- 2x tampone di ibridazione (50 µl)
- Potenziatore per tamponi di ibridazione (20 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)
- A seconda del formato del kit: 16, 32, 48 o 96 adattatori a doppio indice compatibili con Illumina® in formato piastra a 96 pozzetti (7 µl ciascuno):

  vedere l'Appendice 1 per la visualizzazione e le sequenze degli adattatori.

BOX 2 (CONSERVARE TRA +2 °C E +8 °C)

- Dynabeads® M-270 Streptavidin (440 µl)
- Agencourt® AMPure® XP (3 x 1,5 ml per 16 campioni, 8,7 ml per 32 campioni e 11,6 ml per 48 campioni, vedere la nota per 96 campioni)
- IDTE tampone basso TE (10 ml)
- Acqua senza nucleasi (20 ml)

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

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

SOPHiA GENETICS™ DNA LIBRARY PREP KIT I*

(CONSERVARE TRA -25°C E -15°C)

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

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

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

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

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 Se ingerito: chiamare immediatamente un centro antiveleni/un medico. • P302+P352 Se sulla pelle: lavare con abbondante acqua. • P308+P311 In caso di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico. • P321 Trattamento specifico (vedere il consiglio medico su	Pericolo	Cloruro di ammonio tetrametilico

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

Nome del prodotto	GHS Pittogramma	Frasi H e P	Parole di segnalazione	Componente pericoloso
		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 conformità alle normative nazionali.		
Potenziatore per tamponi di ibridazione		• 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,	Pericolo	Formammide

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

Nome del prodotto	GHS Pittogramma	Frasi H e P	Parole di segnalazione	Componente pericoloso
		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.		
10x tampone di lavaggio stringente		• H302 Nocivo se ingerito. • H315 Provoca irritazione cutanea. • H319 Provoca grave irritazione oculare.	Pericolo	Sale sodico dell'acido etilendiammintretracetico
10x tampone di lavaggio I		• H228 Solido infiammabile. • H302 Nocivo se ingerito. • H315 Provoca irritazione cutanea. • H318 Provoca gravi lesioni oculari. • H332 Nocivo se inalato. • H401 Tossico per gli organismi acquatici. • H402 Nocivo per gli organismi acquatici. • H412 Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. • P273 Non disperdere nell'ambiente. • P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. • P305+P351+P338 Se a contatto con gli occhi: sciacquare accuratamente per	Pericolo	Dodecilsolfato sodico

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

Nome del prodotto	GHS Pittogramma	Frasi H e P	Parole di segnalazione	Componente pericoloso
		parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. • P310 Chiamare immediatamente un centro antiveleni/un medico. • P501 Smaltire il contenuto/contenitore in conformità alle normative nazionali.		
DNA Ligase Buffer (tampone DNA ligasi) 5x		• H335 Può irritare le vie respiratorie. • P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso/l'udito.	Avvertenza	poli(etilen-glicole)

Usare e come dispositivo di protezione individuale.

5.1.2. Materiale richiesto (non fornito)

MATERIALI FORNITI DALL'UTENTE (DA ACQUISTARE SEPARATAMENTE)

- Kit amplificazione libreria KAPA™ KK2620 (Roche N. Cat.: 07958978001)
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml
- Provette a basso legame con il DNA da 1,5 ml
- Provette da 1,5 ml
- Provette coniche da 50 ml
- Punte filtro
- Etanolo (grado biologia molecolare)
- Reagenti per il sequenziamento Illumina®.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

ATTREZZATURA DA LABORATORIO

Per evitare la contaminazione del campione:

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

5.2. Preparazione libreria

5.2.1. Preparazione del FFPE genomico

MATERIALI

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

IMPORTANTE

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

PREPARAZIONE

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

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

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

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

PROCEDURA

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

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

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

DILUIZIONE gDNA	
gDNA	200 ng
IDTE	Completare a 30 µl

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

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

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

- A seconda del numero di campioni, procedere come segue:
  - Se si stanno processando **4 campioni**, aggiungere 5 µl di FX Enhancer a ciascuna provetta della striscia da 4 provette contenente 30 µl di campioni di gDNA (un totale di 35 µl in ciascuna provetta della striscia da 4 provette).
  - Se si stanno processando **8 o più campioni**, procedere come segue:
    a. Per facilitare il pipettaggio, creare una riserva di FX Enhancer aggiungendo i seguenti volumi a un nuovo set di strisce da 4 o 8 provette secondo il seguente schema:

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

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

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

5.2.2. Preparazione dei pre-mix e dei reagenti

COMPONENTI E REAGENTI

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

PREPARAZIONE

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

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

- Una volta scongelati i componenti del kit preparazione DNA per libreria I SOPHiA GENETICS™ sono scongelati, mescolare i reagenti invertendo la provetta 5-10 volte e centrifugare brevemente in una microcentrifuga.

PRE-MIX

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

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

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

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

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

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

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

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

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

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

5.2.3. Frammentazione enzimatica, riparazione finale e A-tailing

MATERIALI

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

PREPARAZIONE

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

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

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

PROCEDURA

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

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

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

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

Procedere immediatamente alla legatura.

5.2.4. Legatura

MATERIALI

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

PREPARAZIONE

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

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

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

PROCEDURA

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

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

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

Importante: Non mettere le strisce sul ghiaccio alla fine della legatura perché potrebbe diminuire il legame del DNA alle sfere.

Procedere alla pulizia post legatura.

5.2.5. Pulizia post-legatura

MATERIALI

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

PROCEDURA

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

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

   Rimuovere le provette dal rack magnetico.
10. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 105 µl di acqua senza nucleasi alle sfere e attendere qualche secondo.

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

Procedere alla selezione dimensione doppia

5.2.6. Selezione dimensione doppia

MATERIALI

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

PROCEDURA

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

   Tenere le provette sul rack magnetico per i passaggi successivi.
8. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 170 µl di etanolo all'80% alle sfere.

   Lasciar riposare le provette da 30 secondi a 1 minuto.
9. Eliminare accuratamente l'etanolo usando una pipetta multicanale.
10. Ripetere i passaggi 8 e 9 una volta.
11. Rimuovere l'etanolo residuo usando una pipetta multicanale P10 o P20.
12. Asciugare all'aria le sfere a temperatura ambiente per 4 minuti. Non asciugare troppo le sfere perché questo potrebbe diminuire la quantità di DNA recuperato.

    Rimuovere le provette dal rack magnetico.
13. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 20 µl di IDTE alle sfere. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.

Procedere all'amplificazione della libreria.

5.2.7. Amplificazione della libreria

MATERIALI

- Legatura a doppia dimensione selezionata prodotti e sfere risospese in 20 µl di IDTE ciascuno
- Pre-mix PCR

PREPARAZIONE

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

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

PROCEDURA

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

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

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

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

5.2.8. Pulizia post-amplificazione

MATERIALI

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

PROCEDURA

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

   Tenere le provette sul rack magnetico per i passaggi successivi.
5. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 170 µl di etanolo all'80% alle sfere.

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

   Rimuovere le provette dal rack magnetico.
10. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 20 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 raccogliere tutto il liquido.
11. Posizionare le strisce da 4 o 8 provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
12. Trasferire con attenzione 18 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.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

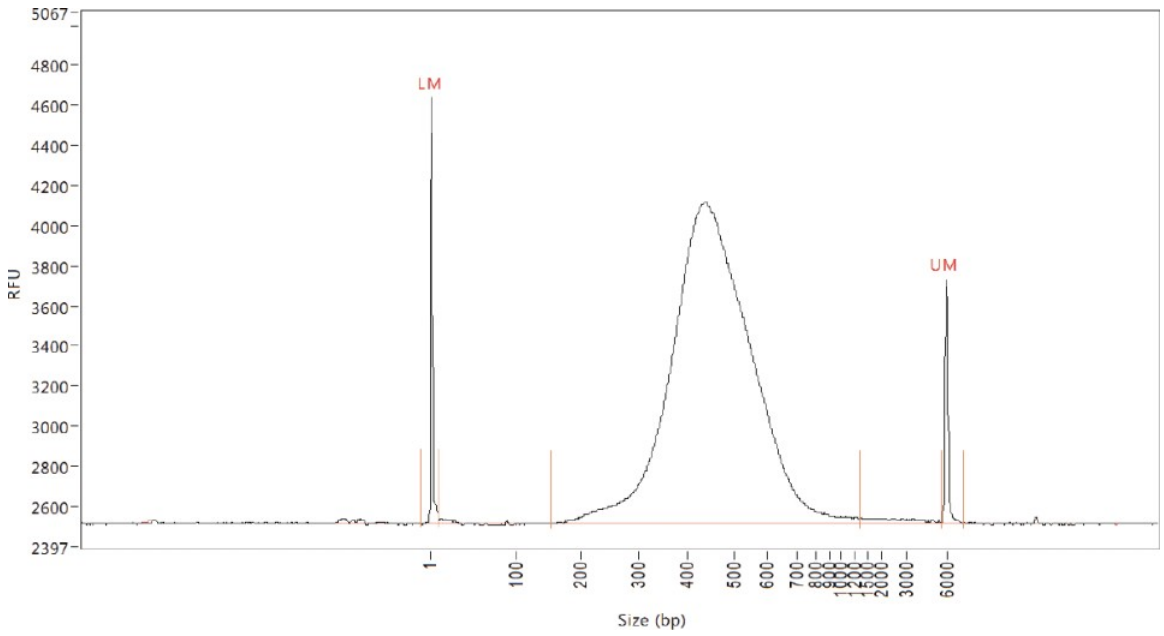
5.2.9. Quantificazione individuale della libreria e controllo qualità

MATERIALI

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

PROCEDURA

1. Preparare una diluizione quadrupla di ciascuna libreria con acqua senza nucleasi (ad es., 2 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).
3. Controllare la qualità delle librerie analizzandone il profilo tramite elettroforesi capillare. I frammenti di DNA della libreria dovrebbero avere una distribuzione delle dimensioni fra 300 bp e 700 bp.



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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

5.3. Cattura

5.3.1. Pooling della libreria

MATERIALI

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

PROCEDURA

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

NUMERO DI CATTURE (Fare riferimento alla tabella del punto 3)	1	2	3	4
Human Cot DNA (in µl)	5	11	16,5	22
Blocchi universali Blocking Oligo xGen - TS Mix (in µl)	2	4,4	6,6	8,8

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

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

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

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

5.3.2. Ibridazione

MATERIALI

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

PREPARAZIONE

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

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

PROCEDURA

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

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

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

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

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

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 110 µl di 1x tampone di lavaggio I a 65 °C in un termoblocco o a bagnomaria per almeno 2 ore. Tenere il restante tampone di lavaggio I a temperatura ambiente.

PREPARAZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO PER 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 220 µl di 1x tampone di lavaggio I a 65 °C in un termoblocco o a bagnomaria per almeno 2 ore. Tenere il restante tampone di lavaggio I a temperatura ambiente.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

PREPARAZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO PER 3 REAZIONI

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

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

PREPARAZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO PER 4 REAZIONI

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

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

5.3.3. Preparazione delle sfere di streptavidina

MATERIALI

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

PROCEDURA

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

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

Importante: Non lasciar asciugare le sfere.

Procedere immediatamente al legame dei target ibridati alle sfere.

5.3.4. Legame di target ibridati alle sfere

MATERIALI

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

PROCEDURA

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

1. Rimuovere le reazioni di ibridazione dal termociclatore e centrifugare brevemente le provette e rimetterle sul termociclatore.
2. Posizionare le provette con le sfere di streptavidina lavate nel termociclatore (non più di due provette alla volta per evitare l'essiccazione delle sfere).

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

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.

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

MATERIALI

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

PROCEDURA

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

Nota:

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.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

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.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

5.3.6. Amplificazione post-cattura

MATERIALI

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

PREPARAZIONE

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

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

PROCEDURA

1. Preparare il pre-mix PCR come segue:

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

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

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

5.3.7. Pulizia post-cattura dell’amplificazione

MATERIALI

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

PROCEDURA

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

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

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

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

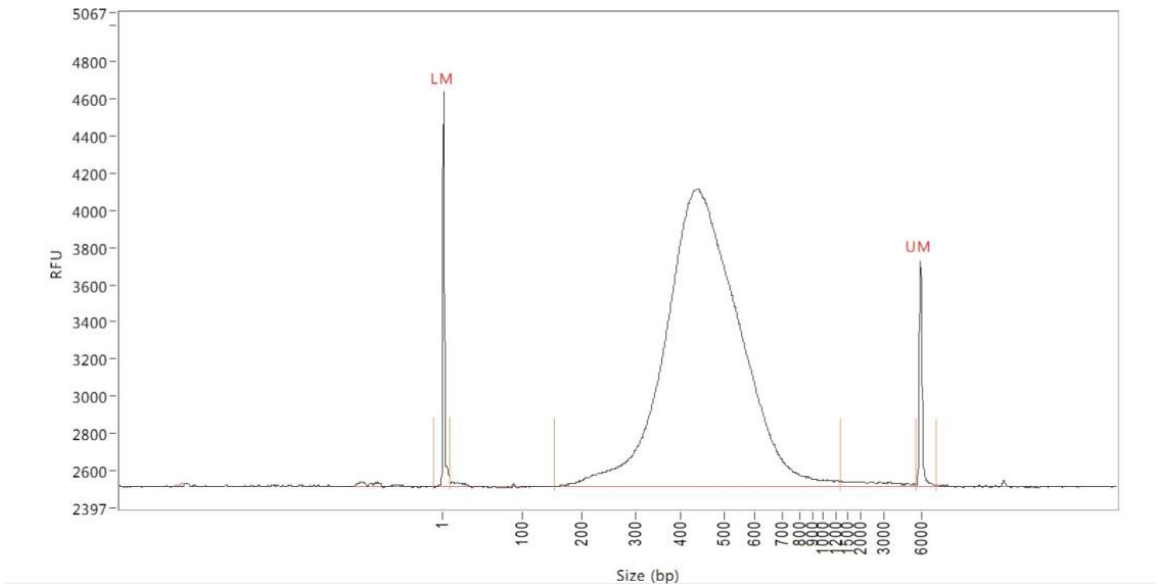
5.3.8. Quantificazione finale della libreria e controllo qualità

MATERIALI

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

PROCEDURA

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



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

5.4. Sequenziamento

5.4.1. Preparazione della libreria per il sequenziamento

MATERIALI

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

PROCEDURA

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

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

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

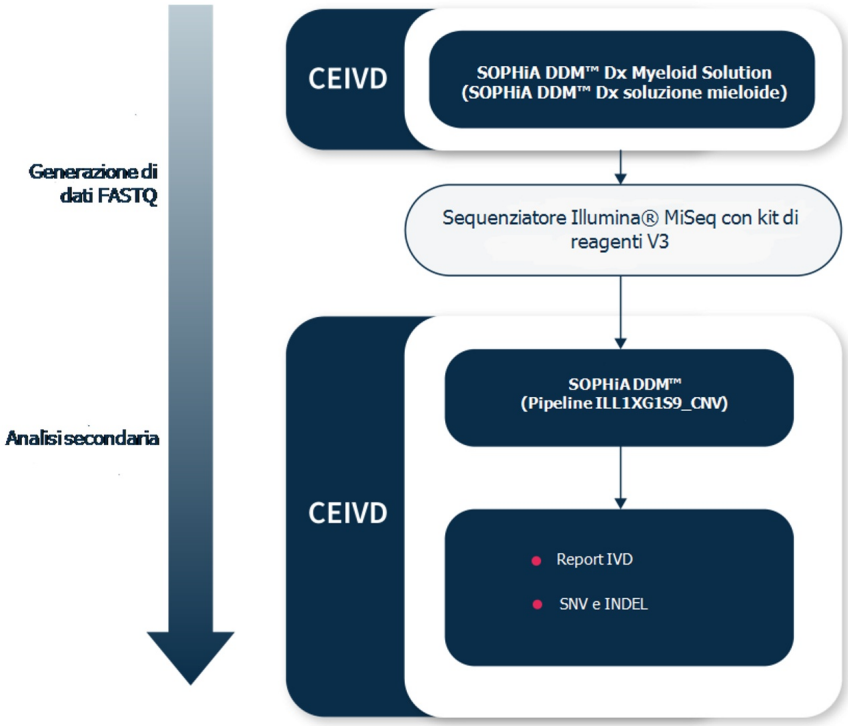
6. PROCEDURA DI ANALISI

6.1. Istruzioni per l'installazione dell'App Web SOPHiA GENETICS™

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

Nota: per accedere alle funzioni CDS, è necessaria l'app desktop SOPHiA DDM™ che può essere scaricata e installata separatamente. L'accesso all'app desktop SOPHiA DDM™ viene concesso contemporaneamente all'accesso all'app web SOPHiA DDM™.

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



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

Si invita a fare riferimento al manuale utente dell'app web SOPHiA DDM™ per la descrizione completa del flusso di lavoro di upload.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

7. LIMITAZIONI, AVVERTENZE E PRECAUZIONI

AVVERTENZE GENERALI

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

LIMITAZIONI GENERALI

- La scarsa qualità dei dati dovuta a problemi nella preparazione del campione o nel passaggio di sequenziamento può confondere l'analisi dei dati e generare falsi positivi e/o falsi negativi.
- L'assenza di una variante nel report non esclude la presenza di una variazione con valori al di sotto dei limiti di rilevamento del test.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

PER PROCEDURE DIAGNOSTICHE IN VITRO

SNV / INDEL

- Il rilevamento delle varianti in questo prodotto è stato ottimizzato per il rilevamento degli SNV e degli INDEL corti (fino a 2/3 della lunghezza della lettura). Si noti che qualsiasi altro tipo di alterazione può essere mancato dall'algoritmo.
    1. Le fusioni o inversioni geniche non possono essere rilevate.
    2. Delezioni o inserzioni con un breakpoint al di fuori della regione target potrebbero non essere rilevate.
- Il rilevamento delle varianti in questo prodotto è stato ottimizzato sulle regioni definite come "regioni target". Si noti che le regioni al di fuori di questa definizione potrebbero generare falsi negativi e/o falsi positivi.
- Per una buona prestazione dell'algoritmo, si raccomanda una copertura di almeno 1.000x per soddisfare la significatività statistica rispetto al rumore per la maggior parte delle posizioni. Una copertura inferiore aumenterà significativamente il rischio di chiamate di varianti false negative.
- Le varianti possono essere mancate o chiamate erroneamente a causa di limitazioni nel design del kit.
- Le varianti nelle regioni per le quali il relativo frammento di DNA non viene estratto dalle sonde non possono essere rilevate dal prodotto. La cattura delle varianti può essere limitata da:
    1. INDEL che influenzano l'ibridazione delle sonde. Questo può portare all'assenza di rilevamento o a una stima errata della frazione della variante.
    2. La presenza di una o più mutazioni aggiuntive nella regione target della sonda sullo stesso allele.
- SNV o INDEL in omopolimeri con una lunghezza di dieci coppie di base o superiore non possono essere chiamati in modo attendibile dal momento che il loro rilevamento è confuso da un elevato rumore di fondo.
- Potrebbero essere segnalate varianti deletion-insertion (delins) complesse come varianti multiple nel caso in cui vengano rappresentate nell'allineamento come più varianti più piccole separate da più di 2 nucleotidi.
- Anche gli SNV o gli INDEL nelle regioni a lunga ripetizione o a bassa complessità specificate nelle regioni contrassegnate nell'Appendice 4 potrebbero essere mancati.
- Le regioni contrassegnate nell'Appendice 4 presentano caratteristiche che rendono inattendibile il rilevamento delle varianti. Vengono segnalate con avvertenze nell'interfaccia SOPHiA DDM™ e le varianti rilevate in queste regioni vengono contrassegnate con un flag.
- Le regioni con un'alta omologia di sequenza possono causare incertezza nella mappatura e il rischio di perdere o chiamare varianti errate.
- Le varianti potrebbero essere rappresentate in forme diverse in una data regione. Se una parte delle letture riporta la variante in una forma diversa o non cattura la variante, la frazione di variante può essere sottostimata, o la variante può essere mancata a causa della bassa frazione.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

- Nel caso di inserzioni/duplicazioni multiple presenti all'interno della stessa regione, non tutte potrebbero essere riportate correttamente. In particolare, quando un'inserzione più piccola è completamente contenuta all'interno di un'inserzione più grande, potrebbe non esserci alcuna lettura che identifichi in modo univoco l'inserzione più piccola, e quest'ultima potrebbe essere mancata e potrebbe essere riportata solo l'inserzione più grande.
- Nel caso di inserzioni/duplicazioni multiple presenti all'interno della stessa regione, non tutte potrebbero essere quantificate correttamente. In particolare, se un'inserzione più piccola è completamente contenuta all'interno di un'inserzione più grande, potrebbe non esserci alcuna lettura che identifichi univocamente l'inserzione più piccola e la frazione di variante riportata per l'inserzione più piccola potrebbe essere sottostimata e la frazione di variante dell'inserzione più grande sovrastimata.
- Il cross-talk del campione dovuto all'index-hoping può essere aggravato dai seguenti fattori:
    1. Copertura molto alta in uno o pochi campioni a causa di problemi durante la quantificazione / normalizzazione del campione o amplificazioni geniche di alto livello
    2. Sovraccarico della cella di flusso, ovvero alta densità del cluster
    3. Differenze nel tasso di conversione della libreria
- Il cross-talk del campione in presenza di una contaminazione dell'indice di basso livello (<1%) può essere aggravato dai seguenti fattori:
    1. Copertura molto alta in uno o pochi campioni a causa di problemi durante la quantificazione / normalizzazione del campione o amplificazioni geniche di alto livello
    2. Sovraccarico della cella di flusso, ovvero alta densità del cluster
    3. Differenze nel tasso di conversione della libreria
- Si raccomanda all'utente di interpretare con cautela le varianti segnalate al di sotto del 2,5% e possibilmente di usare metodi di test alternativi per confermare.
- Qualsiasi problema durante la processazione di NGS o problemi di degradazione del campione può causare un basso rapporto segnale-rumore e influenzare negativamente la chiamata delle varianti.
- Le alterazioni segnalate possono includere alterazioni somatiche (non ereditate) o germinali (ereditate); tuttavia, il test non distingue tra alterazioni germinali e somatiche. Il test non fornisce informazioni sulla suscettibilità.

PER PROCEDURE A SUPPORTO DELLE DECISIONI CLINICHE

INDEL grandi

- Le delezioni più lunghe di circa 5.000 bp potrebbero non essere mappate correttamente e potrebbero essere mancate.
- Inserzioni più lunghe di circa 2/3 della lunghezza della lettura potrebbero essere mancate a causa di una lunghezza di ancoraggio insufficiente per l'identificazione del sito di inserzione.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

- Le duplicazioni che non sono completamente coperte da letture complete (inclusa la sequenza di riferimento duplicata) potrebbero essere mancate.
- Nel caso di una duplicazione in tandem di lunghezza superiore a 1/3 della lunghezza della lettura, il numero esatto di ripetizioni in tandem potrebbe non essere determinato.
- I grandi INDEL, come FLT3 ITD, al di sotto del 10% di frazione di variante potrebbero non essere rilevati. Il limite di rilevamento segnalato del 2,5% non include FLT3 ITD.
- La quantificazione di inserzioni più lunghe della lunghezza della lettura può aumentare il rischio di sovrastimare le frazioni di varianti.

Varianti del numero di copie (CNV)

- Per ottenere prestazioni ottimali dal modulo CNV, è essenziale che tutti i campioni del lotto vengano processati nelle stesse condizioni di laboratorio. Nei processi che comportano l'amplificazione PCR, si raccomanda vivamente di combinare in un unico lotto solo i campioni processati congiuntamente nel passaggio di amplificazione PCR.
- Nel passaggio PCR della preparazione della libreria, i gradienti di temperatura dovrebbero essere evitati il più possibile (ad es. evitando di utilizzare le file esterne delle piastre PCR). I gradienti di temperatura potrebbero produrre falsi positivi nelle chiamate CNV.
- Per una determinazione attendibile del livello di copertura di riferimento, è necessario un numero sufficiente di campioni di riferimento. Per ottenere una buona prestazione, si raccomandano almeno 20 campioni in ciascun lotto (e 8 campioni come minimo assoluto).
- Il modulo CNV viene ottimizzato in modo da ridurre i falsi negativi (CNV mancate). Di conseguenza, è prevedibile un certo numero di falsi positivi e di regioni rifiutate. Si raccomanda di ricontrollare questi casi con un test indipendente (possibilmente usando una tecnologia diversa).
- I campioni potrebbero essere rifiutati per due motivi: o a causa di problemi di qualità nella preparazione della libreria (ad esempio, PCR non riuscita) o a causa di un modello di copertura diverso dal resto dei campioni (per un motivo qualsiasi). Se il numero totale di campioni non rifiutati nel lotto è inferiore a 4, l'intero lotto viene rifiutato.
- L'algoritmo si basa sull'inferenza statistica delle CNV dal confronto dei campioni. Pertanto, presuppone che, per ciascuna regione, le CNV siano presenti solo in una piccola frazione di campioni. Potrebbe non essere possibile rilevare una CNV in lotti con una grande frazione di campioni con CNV nella stessa posizione.
- La performance del modulo CNV è generalmente più alta per CNV più lunghe rispetto alle CNV più corte e anche più alta per le delezioni rispetto alle duplicazioni (inserzioni).
- I primi esoni dei geni presentano spesso maggiori fluttuazioni di copertura a causa del loro più alto contenuto di GC. Di conseguenza, la performance del rilevamento delle CNV è inferiore per gli esoni iniziali dei geni.
- Nel caso di una regione target coperta da una sola sonda, una delezione può essere chiamata in caso di inserzioni o delezioni (INDEL) nella regione della sonda, se sono sufficientemente grandi da sopprimere il legame della sonda.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

- L’algoritmo di rilevamento delle CNV rileva in modo affidabile solo le CNV con regioni target intere (o quasi intere) eliminate o duplicate. Nel caso di CNV con breakpoint all’interno delle regioni target, i confini di queste CNV potrebbero essere determinati in modo errato.
- In presenza di un nuovo pseudogene con identità di sequenza sufficiente per essere amplificato, cioè uno pseudogene non presente nel genoma di riferimento, le letture provenienti dallo pseudogene verranno attribuite al gene genitore. In questo caso il modulo CNV potrebbe sovrastimare il numero di copie del gene affetto. Nel caso in cui lo pseudogene venga ulteriormente amplificato, questo aumenterà ulteriormente il numero di copie stimato.
- Per SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution, l’algoritmo è progettato per rilevare le CNV somatiche. I numeri di copia potrebbero essere frazionari, con la risoluzione di 0,1. Anche la precisione delle stime a livello di copia è di circa 0,1. Piccole deviazioni dal livello di copertura normale (tipicamente, 10% o meno) possono essere mancate.
- Quattro regioni sono escluse dal rilevamento della CNV a causa del livello di rumore tipicamente alto: CEBPA_ex1_1, RUNX1_ex4, SRSF2_ex1, RUNX1_ex9.
- Questo pannello contiene un gene del cromosoma X (ZRSR2). Per un rilevamento attendibile della CNV in questo gene, è necessario determinare il sesso del paziente. La versione attuale dell’algoritmo può dedurre il sesso del paziente dal rapporto della copertura nel cromosoma X e negli autosomi. Questo metodo potrebbe produrre risultati imprecisi e si raccomanda di controllare il valore del sesso determinato automaticamente rispetto ai dati reali del paziente.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

8. VALUTAZIONE DELLA PERFORMANCE NON CLINICHE

8.1. METODI

Informazioni generali

In questo studio, sono state valutate le prestazioni del kit SOPHiA DDM™ Dx MYS e della pipeline SOPHiA DDM™ Dx ILL1XG1S9_CNV con dati generati su uno strumento Illumina MiSeq® utilizzando il test SOPHiA DDM™ Dx MYS. Il filtraggio delle varianti è stato impostato in base al rumore di fondo misurato nei campioni di diluizione germinale, e le presenti affermazioni riguardano le varianti al di sopra del limite di rilevamento determinato dai nostri esperimenti.

Gli omopolimeri di 10 bp o più sono stati esclusi, così come le regioni coperte da meno di 1000 letture. Per ciascun campione sono state confrontate le varianti rilevate dalla pipeline con le varianti confermate “gold standard” fornite da ciascuno dei centri di sequenziamento. Le varianti rilevate al di fuori delle regioni target non sono state considerate (vedere l’Appendice 4 per l’elenco completo delle regioni target e delle regioni contrassegnate). Una regione, l’esone 15 di JAK2 imbottito di 25 bp, presentava una copertura costantemente inferiore e quindi è stata esclusa dalle nostre analisi.

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

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

Per tutte le posizioni coperte dal pannello SOPHiA DDM™ Dx MYS e per le quali erano disponibili informazioni di riferimento, sono stati determinati i numeri delle seguenti categorie: i veri positivi (True Positives (TP)) e i veri negativi (True Negatives (TN)) sono presenti in entrambi i set, i falsi positivi (False Positives (FP)) sono presenti solo nelle varianti rilevate da SOPHiA DDM™ Dx e i falsi negativi (False Negatives (FN)) sono presenti solo nella tabella delle varianti confermate. Tutte le posizioni schermate (TP+FP+TN+FN) sono state determinate sottraendo le posizioni indeterminate dalla regione target del pannello SOPHiA DDM™ Dx MYS, che è CDS ± 25 bp dei geni e degli esoni specificati nella documentazione SOPHiA DDM™ Dx MYS:

- Regioni indefinite: regioni contenenti varianti a bassa attendibilità, o varianti confermate sotto la soglia di segnalazione, e per determinare la riproducibilità e la ripetibilità, regioni sotto la profondità di 1000x (per valutare la riproducibilità e la ripetibilità della copertura)
- L’esone 15 di JAK2, che è stato identificato come una regione in cui la copertura è difficile
- Regioni note con artefatti (regioni contrassegnate)
- Regioni in cui non erano disponibili dati di riferimento o in cui i dati erano ambigui (vedere anche 5.1.3). Per esempio, il sequenziamento Sanger non può riportare grandi INDEL in FLT3, quindi queste varianti sono state escluse.

Inoltre, gli INDEL situati in regioni omopolimeriche di almeno 10 bp sono stati esclusi dai calcoli.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

Tutti i parametri sono stati calcolati con le seguenti formule:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. **Ripetibilità della variante** - per calcolare la frazione di basi in entrambi i replicati vengono prese in considerazione tutte le posizioni ben definite in entrambi i replicati. Date le repliche intra-prova A e B con posizioni ben definite SPA e SPB, SPA[i] e SPB[i] rappresentano lo stato della variante nella posizione i. Essendo dx l'operatore che restituisce 1 quando x=0 e 0 quando x¹0, la ripetibilità della variante viene definita come:

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

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

$$Ripetibilità = Ripetibilità\ della\ variante\ x\ Ripetibilità\ del\ sequenziamento\ x\ 100$$

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

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

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

8.2. DATI

I campioni disponibili sono stati raggruppati in due categorie a seconda della caratterizzazione ad alta attendibilità disponibile per tutti i confronti di riferimento. In primo luogo, i campioni parzialmente caratterizzati in cui sono state identificate varianti note ad alta attendibilità sono stati processati da SOPHiA GENETICS™ (sito A) o da partner esterni (siti da B a E) con le condizioni sperimentali raccomandate.

Questi risultati contengono una vasta casistica clinica rappresentativa e permettono di stimare la sensibilità per la denominazione delle varianti. Inoltre, sono stati inclusi i replicati per stimare la ripetibilità e la riproducibilità. La seconda categoria di campioni è costituita da campioni di riferimento con regioni ad alta attendibilità date dal fornitore o varianti ad alta attendibilità GIAB (Genome in a bottle), e campioni clinici in cui ampie porzioni delle regioni target SOPHiA DDM™ Dx MYS sono state analizzate mediante sequenziamento Sanger o altri metodi ad alta accuratezza (tenendo conto dei limiti di rilevamento dei rispettivi metodi). Questo insieme di campioni ben caratterizzati permette di determinare la specificità, la precisione e l'accuratezza, nonché la sensibilità. I dati di input provengono da diverse prove su più pazienti (un file di sequenza per ciascun paziente) eseguite da quattro centri di sequenziamento distinti: Sito A-E. Tutti i file di una prova sono stati analizzati congiuntamente come parte dello stesso processo di lotto.

8.3. CONCLUSIONI GENERALI

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

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

Prova	N. di campioni	TP	FN
SiteA_Run01	1	15	0
SiteA_Run02	15	36	0
SiteA_Run03	16	37	0
SiteA_Run04	1	2	0
SiteA_Run06	1	15	0

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

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

Prova	N. di campioni	TP	FN
SiteA_Run07	21	31	0
SiteA_Run08	20	142	0
SiteA_Run09	20	142	0
SiteA_Run10	24	599	0
SiteA_Run11	10	15	0
SiteA_Run14	8	8	0
SiteA_Run15	14	14	0
SiteB_Run01	22	78	0
SiteB_Run02	18	55	1
SiteC_Run01	11	57	0
SiteC_Run02	10	40	0
SiteD_Run01	10	15	0
SiteE_Run01	15	31	0
Totale	**237**	**1332**	**1**

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

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

Prova	N. di campioni	TP	FN	FP	TN
SiteA_Run08	18	132	0	0	469693
SiteA_Run09	18	132	0	0	469231
Altro	11	152	0	2	480194
Totale	**47**	**416**	**0**	**2**	**1419118**

La seguente tabella mostra le posizioni uniche della base TN e le varianti rilevate in questo studio di valutazione della performance. Il numero totale di posizioni di base nelle regioni analizzate è stato 48093 basi. Nello studio sono state rilevate 219 (duecentodiciannove) varianti uniche confermate. I veri negativi unici in cui sono stati disponibili dati di riferimento ad alta attendibilità hanno coperto un totale di 48092 bp, che a loro volta coprono il 99% delle regioni target meno l'esone JAK2 escluso (48547 bp).

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

Tabella 4. Riepiloghi delle varianti in tutte le prove

TP	219
FP	2
FN	1
TN	48092

8.4. RISULTATI

La combinazione dello strumento Illumina MiSeq® o HiSeqTM, del test SOPHiA DDM™ Dx MYS e di SOPHiA DDM™ Dx porta a una performance osservata del 99,92% di sensibilità, 99,99% di specificità, 99,99% di accuratezza, 99,52% di precisione, 98,69% di ripetibilità e 99,30% di riproducibilità.

Tabella 5. Riepilogo della performance

N°	Misurazione della performance	Media	5° percentile
A	Tasso on-target	87,41%	[59,59%]
B	Uniformità	99,88%	[99,40%]
C	Limite di rilevamento	2,5%* (osservato)	[1%]

N°	Misurazione della performance	Osservato	[IC meno del 95%]**
1	Sensibilità	99,92%	[97,49%]
2	Specificità	99,99%	[99,98%]
3	Accuratezza	99,99%	[99,98%]
4	Precisione	99,52%	[91,47%]

N°	Misurazione della performance	Osservato	[IC meno del 95%]***
5	Ripetibilità	98,69%	[98,66%]
6	Riproducibilità	99,30%	[99,27%]

* Per SNV e INDEL; tranne FLT3 ITD.

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

*** Gli IC al 95% sono stati calcolati su tutte le posizioni per tutti i campioni. La ripetibilità e la riproducibilità si basano sui confronti descritti nell'equivalenza della selezione della doppia dimensione e della riproducibilità inter-sito.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

9. SIMBOLI

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

10. SUPPORTO

In caso di difficoltà nell'utilizzo dell’app web SOPHiA DDM™, consultare la sezione “Risoluzione dei problemi” del manuale d'uso dell'app web SOPHiA DDM™ disponibile sull’app web SOPHiA DDM™ 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 dell’app web SOPHiA DDM™.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

APPENDICE 1. PIASTRE ADATTATRICI A DOPPIO INDICE

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

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

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

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

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

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

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

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

APPENDICE

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

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

APPENDICE 2. ATTREZZATURA DI LABORATORIO USATA NEL LABORATORIO DI SOPHiA GENETICS™

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

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

APPENDICE

ZONA PRE-PCR	FORNITORE	NOME PRODOTTO	N° di CATALOGO
quantificazione fluorometrica	Scientific	Qubit dsDNA HS Assay kit (kit di test)	Q32854
Pipette monocanale (P10; P100; P200; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100- 1100, S7100-2200, S7100-1000

ZONA POST-PCR	FORNITORE	NOME PRODOTTO	N° di CATALOGO
Termociclatore con coperchio riscaldato programmabile	Biometra	TAdvanced 96	
Sistema di elettroforesi capillare	Advanced Analytical	Agilent Fragment Analyzer (Agilent analizzatore frammenti)	
Concentratore di vuoto (SpeedVacTM o simile)	Thermo Fisher Scientific	Savant DNA120-230	
Riscaldatore a blocco secco o bagnomaria (compatibile con provette da 1,5 ml)	Techne	Dri-Block DB-1	
Rack a separazione magnetica (compatibile con provette da 1,5 ml)	Thermo Fisher Scientific	MagJET Separation Rack (MagJET rack di separazione), 12 provette da 1,5 ml	MR02
Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti	Alpaqua	96S Super Magnet Plate	A001322
Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti	Thermo Fisher Scientific	DynaMag-96 Side Magnet (DynaMag-96 magnete laterale)	12331D
Miscelatore a vortice	Grant instrument	Miscelatore a vortice multi-provetta, V32	
Miscelatore a vortice	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Microcentrifuga da banco (compatibile con strisce da 8 provette)	StarLab	Mini centrifuga	N2631-0007
Pipette multicanale (P10; P100; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108- 1100, S7108-3300

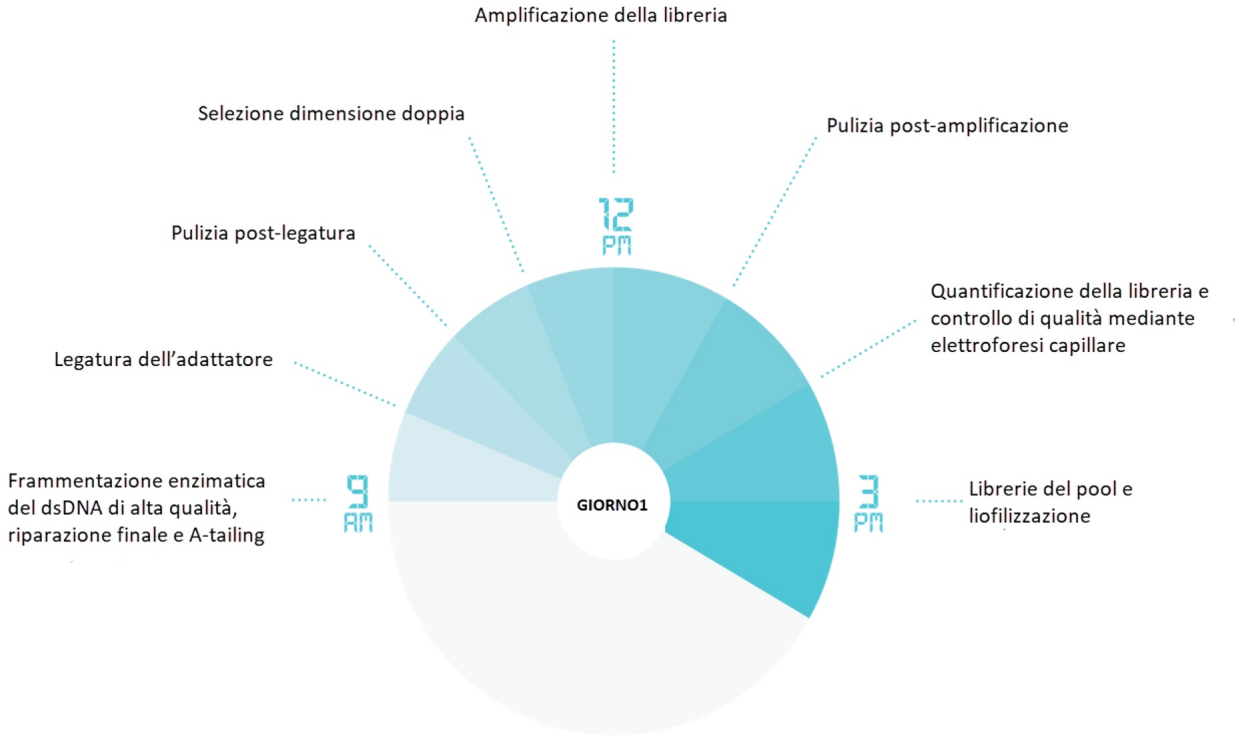
© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

APPENDICE

ZONA POST-PCR	FORNITORE	NOME PRODOTTO	N° di CATALOGO
Attrezzatura e reagente per la quantificazione fluorometrica	Thermo Fisher Scientific	Qubit 3.0 Fluorometer (fluorometro) & Qubit dsDNA HS Assay kit (kit di test)	Q33216 & Q32854
Pipette monocanale (P10; P100; P200; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100- 1100, S7100-2200, S7100-1000

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

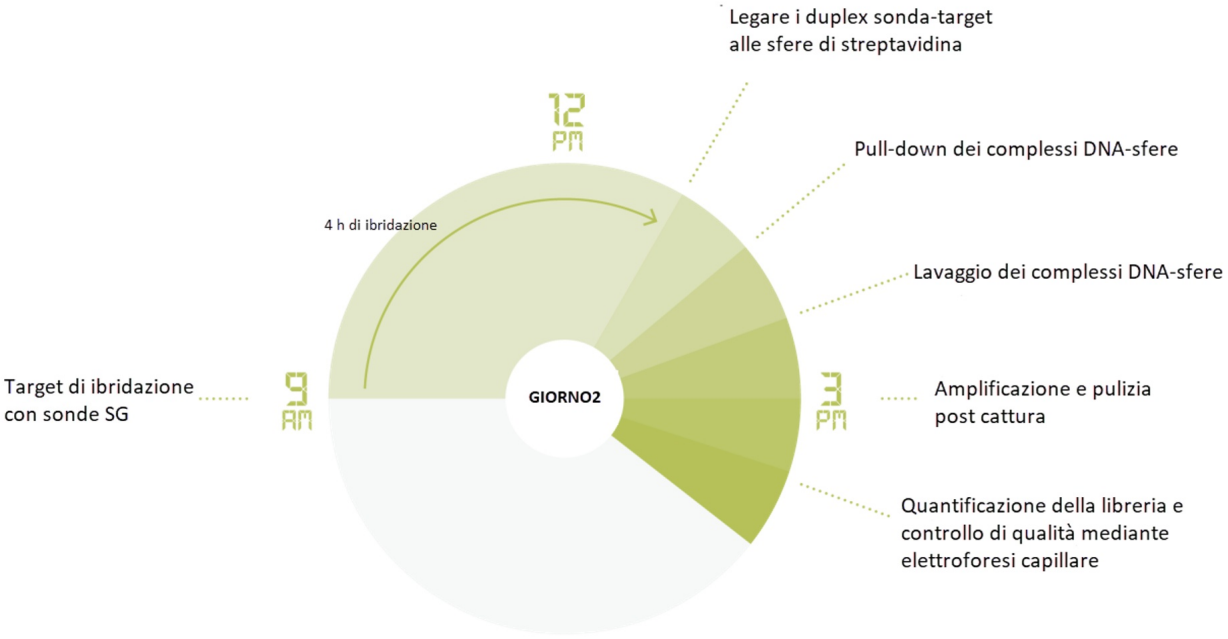
APPENDICE 3. FLUSSO DI LAVORO GENERALE - SOPHiA DDM™ CAPTURE SOLUTIONS



Preparazione libreria
Con kit preparazione DNA per libreria I SOPHiA GENETICS™

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

APPENDICE



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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

APPENDICE 4. ELENCO DELLE REGIONI TARGET E REGIONI APPLICABILI E CONTRASSEGNATE

REGIONI TARGET*

CROMOSOMA	INIZIO	FINE
1	36931671	36931826
1	36931932	36932534
1	36932805	36932937
1	36933133	36933277
1	36933397	36933588
1	36933650	36933847
1	36934731	36934883
1	36935227	36935466
1	36937008	36937272
1	36937641	36937765
1	36937813	36938017
1	36938092	36938312
1	36939010	36939248
1	36939339	36939513
1	36940952	36941299
1	36945008	36945122
1	43814908	43815055
1	115256395	115256624
1	115258645	115258806
2	25457122	25457314
2	25458550	25458719
2	25459779	25459899
2	25461973	25462109
2	25463145	25463344
2	25463483	25463624

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

APPENDICE

CROMOSOMA	INIZIO	FINE
2	25464405	25464601
2	25466741	25466876
2	25466998	25467232
2	25467383	25467546
2	25468096	25468226
2	25468863	25468958
2	25469003	25469203
2	25469463	25469670
2	25469894	25470052
2	25470434	25470643
2	25470880	25471146
2	25472500	25472618
2	25475037	25475091
2	25497784	25497981
2	25498343	25498437
2	25505231	25505605
2	25522982	25523137
2	25536756	25536878
2	198266440	198266637
2	198266683	198266879
2	198267254	198267575
2	198267647	198267784
2	198268283	198268513
2	198269774	198269926
2	198269973	198270221
2	209113067	209113409
4	55561652	55561972
4	55589724	55589889
4	55591997	55592241
4	55593358	55593515

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

APPENDICE

CROMOSOMA	INIZIO	FINE
4	55593556	55593733
4	55594151	55594312
4	55599210	55599383
4	55602638	55602800
4	106155074	106158622
4	106162470	106162611
4	106163965	106164109
4	106164701	106164960
4	106180750	106180951
4	106182890	106183030
4	106190741	106190929
4	106193695	106194100
4	106196179	106197701
5	170834678	170834803
5	170837505	170837594
7	140453049	140453218
7	148504712	148504823
7	148506137	148506272
7	148506376	148506507
7	148507399	148507531
7	148508691	148508837
7	148511025	148511254
7	148511980	148512156
7	148512572	148512663
7	148513750	148513895
7	148514288	148514508
7	148514943	148515234
7	148516662	148516804
7	148523520	148523749
7	148524230	148524383

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

APPENDICE

CROMOSOMA	INIZIO	FINE
7	148525806	148525997
7	148526794	148526965
7	148529700	148529867
7	148543536	148543715
7	148544248	148544415
9	5021962	5022238
9	5029757	5029931
9	5044377	5044545
9	5050660	5050856
9	5054537	5054909
9	5055643	5055813
9	5064857	5065065
9	5066652	5066814
9	5068996	5069233
9	5069899	5070077
9	5072466	5072651
9	5073672	5073810
9	5077427	5077605
9	5078280	5078469
9	5080203	5080405
9	5080507	5080708
9	5081699	5081886
9	5089648	5089888
9	5090420	5090595
9	5090713	5090936
9	5122978	5123146
9	5126307	5126471
9	5126658	5126816
9	133738124	133738447
9	133747490	133747625

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

APPENDICE

CROMOSOMA	INIZIO	FINE
9	133748221	133748449
9	133750229	133750464
9	133753776	133753979
9	133755429	133755569
11	533740	533969
11	534186	534347
11	32410578	32410750
11	32413492	32413635
11	32414186	32414326
11	32417777	32417978
11	32421468	32421615
11	119148850	119149032
11	119149194	119149448
12	11803036	11803119
12	11905358	11905538
12	11992048	11992263
12	12006335	12006520
12	12022332	12022928
12	12037353	12037546
12	12038834	12038985
12	12043849	12044005
12	25380142	25380371
12	25398182	25398343
12	112888096	112888341
12	112910722	112910869
12	112915429	112915559
12	112915635	112915844
12	112919852	112920034
12	112924253	112924458
12	112926221	112926339

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

APPENDICE

CROMOSOMA	INIZIO	FINE
12	112926802	112927004
13	28592578	28592751
13	28607998	28608153
13	28608193	28608376
13	28608412	28608569
15	90631793	90632004
17	7572901	7573033
17	7573901	7574058
17	7576511	7576682
17	7576827	7576951
17	7576993	7577180
17	7577473	7577633
17	7578151	7578314
17	7578345	7578579
17	7579286	7579615
17	7579674	7579746
17	7579813	7579937
17	74732855	74733267
18	42529820	42533330
19	13054501	13054752
19	33792218	33793345
20	31019360	31019507
20	31021061	31021745
20	31022209	31025166
21	36164406	36164932
21	36171572	36171784
21	36193939	36194018
21	36206681	36206923
21	36231745	36231900
21	36252828	36253035

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

CROMOSOMA	INIZIO	FINE
21	36259114	36259434
21	36265196	36265285
21	36421113	36421221
21	44514739	44514923
21	44524399	44524537
X	15808593	15808684
X	15809031	15809161
X	15817969	15818101
X	15821785	15821944
X	15822208	15822345
X	15826330	15826419
X	15827297	15827466
X	15833774	15834038
X	15836684	15836790
X	15838304	15838464
X	15840828	15841390

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

REGIONI CONTRASSEGNATE APPLICABILI**

CROMOSOMA	INIZIO	FINE	DESCRIZIONE	GENE_ EXON
1	36933564	36933584	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti di sequenziamento se viene utilizzata la chimica Illumina® V2	CSFR3_ ex14
17	7572977	7573010	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti di sequenziamento se viene utilizzata la chimica Illumina® V2	TP53_ ex11
18	42533111	42533125	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti di	SETBP1_ ex04

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

APPENDICE

CROMOSOMA	INIZIO	FINE	DESCRIZIONE	GENE_ EXON
			sequenziamento se viene utilizzata la chimica Illumina® V2	
21	36206686	36206787	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti di sequenziamento se viene utilizzata la chimica Illumina® V2	RUNX1_ ex07
2	198267762	198267783	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti sperimentali	SF3B1_ ex13
5	170837510	170837526	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti sperimentali	NPM1_ ex11
9	5126453	5126462	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti di sequenziamento se viene utilizzata la chimica Illumina® V2	JAK2_ ex24
11	119149355	119149373	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti di sequenziamento se viene utilizzata la chimica Illumina® V2	CBL_ ex09
19	33792754	33792775	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti di sequenziamento se viene utilizzata la chimica Illumina® V2	CEBPA_ ex01
19	33793007	33793041	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti di sequenziamento se viene utilizzata la chimica Illumina® V2	CEBPA_ ex01
20	31022441	31022449	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti di sequenziamento se viene utilizzata la chimica Illumina® V2	ASXL1_ ex12

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

APPENDICE

CROMOSOMA	INIZIO	FINE	DESCRIZIONE	GENE_ EXON
7	148543693	148543705	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti sperimentali	EZH2_ ex41
17	74733013	74733013	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti sperimentali	SRSF2_ ex1
20	31022262	31022262	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti sperimentali che causano letture chimeriche	ASXL1_ ex12
18	42531410	42531410	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti sperimentali che causano letture chimeriche	SETBP1_ ex04
12	112919878	112920009	Questa regione è altamente omologa	PTPN11_ ex10

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

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

© SOPHiA GENETICS™ 2023. Tutti i diritti riservati.

Document Approvals

Approved Date: 20 Mar 2023

Approval Verdict: Approve	Shala Barnett, (sbarnett@sophiagenetics.com) Regulatory Approval 17-Mar-2023 16:03:31 GMT+0000

Approval Verdict: Approve	Dawn Little, (DLittle@sophiagenetics.com) Regulatory Approval 20-Mar-2023 13:49:26 GMT+0000

QA Approval Verdict: Approve	Erin Gunduz, (egunduz@sophiagenetics.com) Quality Assurance Approval 20-Mar-2023 15:46:49 GMT+0000

This copy of the document was retrieved from the system by System on 21 Apr 2023