

ISTRUZIONI PER L'USO

32 CAMPIONI

SOPHiA DDM™ Dx **Homologous Recombination** **Deficiency Solution**



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





SINTESI DELLE INFORMAZIONI

Nome prodotto	SOPHiA DDM™ Dx Homologous Recombination Deficiency Solution
Tipo di prodotto	Soluzione bundle
Famiglia di prodotti	Applicazione di diagnostica molecolare (kit + analisi)
ID algoritmo	ILL1XG1S7_FFPE_CNV_NextSeq_2
Sequenziatore	Illumina® - NextSeq® 500/550
ID pannello geni	HRD_v1
Versione del prodotto	v1.0
Tipo di campione	DNA somatico isolato da campioni di tessuto tumorale fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE).
Versione di lancio	SOPHiA DDM™ Core: v6.4.0 / SOPHiA DDM™ Dx mode: v2.4.0
ID documento	SG-00694
Versione del documento	v5.0
Data di revisione	Gennaio 2026

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



SOPHiA GENETICS SA
ZA La Pièce 12
1180 Rolle
Switzerland



BS0121ILLCSMY08-32



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





CODICI DEI PRODOTTI

	CODICE PRODOTTO COMPLETO	BOX 1	BOX 2	KIT PREPARAZIONE LIBRERIA
REF	BS0121ILLCSMY08-32	B1.H1.0021.C-32	B2.0021.C-32	5C0232 (x 2)



ESONERO DA RESPONSABILITÀ

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

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

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

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

MARCHI COMMERCIALI

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

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

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

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

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



CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

ID DOCUMENTO/ VERSIONE	DATA	Versione equivalente delle istruzioni per l'uso in inglese	DESCRIZIONE DELLA MODIFICA
SG-00694 (v5.0)	Gennaio 2026	SG-00661 (v11.0)	- Modifica al sistema di numerazione delle versioni, nessuna versione aggiuntiva tra la versione 2.3 e la versione 5.0. - Aggiunta una nuova colonna nella tabella della cronologia delle revisioni per tenere traccia della versione inglese corrispondente; la colonna è vuota per tutte le revisioni precedenti. - Sezione 2 – Eliminazione del paragrafo che descrive l'App SOPHiA DDM Desktop e le funzionalità per uso esclusivo di ricerca - Sezione 3 – Rimozione della descrizione dei componenti per il solo uso di ricerca, perfezionato l'ambito IVD del prodotto - Figura 1 – Modifica del nome della piattaforma di analisi da SOPHiA DDM Web App a SOPHiA DDM Dx Mode, rimozione dei componenti al di fuori dell'ambito IVD - Sezione 5.1.1 – Aggiunta delle limitazioni dei cicli di congelamento/scongelamento per i reagenti contenuti nel Box 1 e nel Library Prep Kit III - Avvertenze e Precauzioni – Aggiunta dei numeri di identificazione CAS e delle concentrazioni per ciascun componente pericoloso identificato - Sezione 8 – Aggiunta della sottosezione Interferenze endogene ed esogene (8.1.5) e della sottosezione Riporto e contaminazione crociata (8.1.6) - Sezione 9.1 – Rimozione delle avvertenze fuori dall'ambito IVD - La Sezione 9.2.1 è stata fusa nella Sezione 9.2, Limitazioni generali - Sezione 9.3.1 – Rimozione delle procedure di supporto CDS, SNP/Indel, Stato HRD proposto per BRCA e SOPHiA DDM, variazione del numero di copie - Rimozione dell'appendice su CDS SOPHiA DDM HRD - Rimozione dell'appendice sulle coordinate genomiche dei target SNP della soluzione HRD - Rimozione dell'appendice sulle coordinate genomiche delle regioni target CNV della soluzione HRD - Modifiche minori alla formattazione e alla sequenza dei numeri per didascalie, numeri di sezione e appendici - Modifiche estetiche minori - Riduzione del volume del contenuto delle sonde di ibridazione SOPHiA GENETICS da 20 µl a 18 µl - Sezioni 5.1.1, 5.3.1 e 5.3.2 – Eliminazione della proprietà intellettuale di fornitori terzi - Sezione 9.3.1 – Aggiornamento delle limitazioni



ID DOCUMENTO/ VERSIONE	DATA	Versione equivalente delle istruzioni per l'uso in inglese	DESCRIZIONE DELLA MODIFICA
			• Armonizzazione del testo in più sezioni e appendici • "App Web SOPHiA DDM™" → "Modalità SOPHiA DDM™ Dx" + riformulazioni correlate • SOPHiA GENETICS™ → SOPHiA GENETICS • Inserimento del simbolo TM in tutto il documento • Cronologia revisioni – nella versione 4.0 aggiornata qualità del DNA con quantità di DNA • Correzioni nella sezione “Importante” (quantità di DNA) • Correzione dell'ultimo punto della sezione Avvertenze (9.1)
SG-00694 (v2.3)	Settembre 2025		• Aggiornamento dell'indirizzo REP della CE
SG-00694 (v2.2)	Marzo 2025		• Sezione 5.1.1 Contenuto del kit - BOX 1: aumento del volume del tampone di ibridazione 2x da 50 µl a 75 µl; aumento del volume del Potenziatore per tamponi di ibridazione da 20 µl a 30 µl.
SG-00694 (v2.1)	Agosto 2024		• Sezione 5.2.1 - Modificata la soglia della lunghezza del frammento DQN da "300" a "375" bp • Sezione 5.2.1 - Aggiunto codice prodotto "DNF-464-0500" per il kit HS Large Fragment 50kb su Agilent Fragment Analyser™
SG-00694 (v2.0)	Maggio 2022		• Modifica del nome del kit di preparazione della libreria • Correzione dei refusi nella sezione 5.2.4 • Tabella dei simboli aggiornata
SG-00609 (v1.0)	Maggio 2022		• Release iniziale



SOMMARIO

1. FINALITÀ PREVISTE	9
2. DICHIARAZIONE GENERALE DEI PRINCIPI E DELLA PROCEDURA DEL TEST	10
3. COMPONENTI DEL PRODOTTO.....	11
4. SOPHiA DDM™ DX MODE.....	12
5. MATERIALI E METODI DEL KIT	13
5.1. Considerazioni iniziali.....	13
5.1.1. Contenuto del kit (32 campioni).....	13
5.1.2. Materiale richiesto (non fornito).....	18
5.2. Preparazione libreria.....	19
5.2.1. Preparazione del DNA.....	19
5.2.2. Preparazione dei pre-mix e dei reagenti.....	20
5.2.3. Frammentazione enzimatica, riparazione finale e A-tailing.....	22
5.2.4. Legatura.....	23
5.2.5. Pulizia post-legatura.....	24
5.2.6. Amplificazione della libreria.....	25
5.2.7. Pulizia post-amplificazione	26
5.2.8. Quantificazione individuale della libreria e controllo qualità.....	27
5.2.9. Pooling delle librerie per il sequenziamento dell'intero genoma (WGS) low-pass	28
5.3. Cattura.....	29
5.3.1. Pooling della libreria per ibridazione e cattura	29
5.3.2. Ibridazione	29
5.3.3. Preparazione delle sfere di streptavidina.....	32
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.....	38
5.4.1. Preparazione della libreria per il sequenziamento.....	38
6. PROCEDURA DI ANALISI	40
6.1. Demultiplexing dei dati NGS.....	40
6.2. Caricamento e analisi dei dati	40
6.3. Generazione di report.....	40
7. DESCRIZIONE DELL'ANALISI E PARAMETRI	43
7.1. File delle risorse.....	43
7.2. Pre-elaborazione dei dati grezzi.....	43
7.3. Analisi dell'integrità genomica	43
7.4. Calcolo dello stato di SOPHiA DDM™ Dx HRD	45
8. VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI	46
8.1. Valutazione delle prestazioni analitiche	46



8.1.1. Concordeza dello stato di integrità genomica con l'analisi NGS di confronto	46
8.1.2. Stato di integrità genomica Limite di rilevamento del contenuto tumorale del campione	46
8.1.3. Ripetibilità dello stato di integrità genomica	46
8.1.4. Riproducibilità dello stato di integrità genomica	47
8.1.5. Interferenze esogene e esogene	47
8.1.6. Carry over e contaminazione crociata	47
8.2. Valutazione delle prestazioni cliniche	48
9. AVVERTENZE, LIMITAZIONI E PRECAUZIONI	49
9.1. Avvertenze	49
9.2. Limitazioni	49
9.3. Precauzioni	50
10. SIMBOLI	51
11. SUPPORTO	52
APPENDICE I. PIASTRE PRIMER PER DOPPIO INDICE UNIVOCO	53
APPENDICE II. FLUSSO DI LAVORO GENERALE – SOPHIA DDM™ CAPTURE SOLUTIONS	55



1. FINALITÀ PREVISTE

SOPHiA DDM™ Dx Homologous Recombination Deficiency (HRD) Solution è un dispositivo medico-diagnostico in vitro che può essere utilizzato come ausilio per determinare lo stato di deficit di ricombinazione omologa (HRD) dei tumori in pazienti con carcinoma ovarico mediante la rilevazione semiquantitativa del biomarcatore di instabilità genomica. Il dispositivo è destinato all'uso da parte di operatori sanitari e si basa su un flusso di lavoro di sequenziamento di nuova generazione (NGS) che utilizza come input il DNA genomico estratto da materiale tumorale sottoposto a trattamento FFPE.



2. DICHIARAZIONE GENERALE DEI PRINCIPI E DELLA PROCEDURA DEL TEST

La soluzione SOPHiA DDM™ Dx HRD è composta da un kit NGS e da una pipeline bioinformatica utilizzata in combinazione con un accessorio IVD, la piattaforma basata su cloud SOPHiA DDM™ Dx mode. Il prodotto è destinato all'elaborazione e all'analisi di campioni di DNA estratti da campioni biotipici o di resezione chirurgica di cancro ovarico fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE).

Il kit e il protocollo NGS sono progettati per consentire agli utenti di elaborare 50-100 ng di DNA per la costruzione di librerie NGS, l'arricchimento della cattura basata sull'ibridazione di 28 geni e il sequenziamento mediante la piattaforma Illumina® NextSeq® 500/550. I dati NGS risultanti sono caratterizzati da una bassa copertura dell'intero genoma con una copertura prevista di ~1x (dati di sequenziamento del genoma intero a basso passaggio, lpWGS) e da un'alta copertura nelle regioni di sequenziamento mirate (copertura prevista: ~3000x media).

La modalità sicura SOPHiA DDM™ Dx basata sul cloud, che ospita una pipeline bioinformatica personalizzata, consente di caricare i dati NGS e di ottenere un rapporto SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution in formato PDF. Il rapporto descrive lo stato del campione SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution determinato in base all'analisi dell'integrità genomica (GI).

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)).



3. COMPONENTI DEL PRODOTTO

SOPHiA DDM™ Dx HRD è una soluzione completa che unisce il kit di caratterizzazione del target con la potenza di analisi dell'AI, combinata con l'accesso alla modalità sicura e basata sul cloud della modalità SOPHiA DDM™ Dx. Il prodotto è costituito da due componenti: il kit di preparazione della libreria e di cattura (SOPHiA GENETICS™ Dx DNA Library Prep Kit III - 32 reazioni) e la pipeline di analisi bioinformatica utilizzata in combinazione con la modalità SOPHiA DDM™ Dx.

- Il kit è composto da reagenti e protocolli per supportare la preparazione e la caratterizzazione di librerie target, compatibili con Illumina®, da librerie di DNA provenienti da campioni FFPE di cancro ovarico, adatte per la caratterizzazione e il sequenziamento su sequenziatore Illumina® NextSeq® 500/550. Il kit di caratterizzazione del target consente agli utenti di generare in un'unica sessione di sequenziamento sia dati WGS low-pass (copertura ~1x) che dati di sequenziamento profondo mirato (copertura ~3000x).
- Lo scopo principale della pipeline bioinformatica è quello di elaborare i dati WGS low-pass, tramite un algoritmo di deep-learning in grado di valutare l'integrità genomica, per stabilire lo stato SOPHiA DDM™ Dx HRD.
- La modalità SOPHiA DDM™ ospita la pipeline bioinformatica e funge da interfaccia grafica per il caricamento dei dati di sequenziamento di nuova generazione (NGS) e la generazione e il download del report SOPHiA DDM™ Dx HRD. Fare riferimento alla modalità SOPHiA DDM™ Dx per le istruzioni dell'App Web.

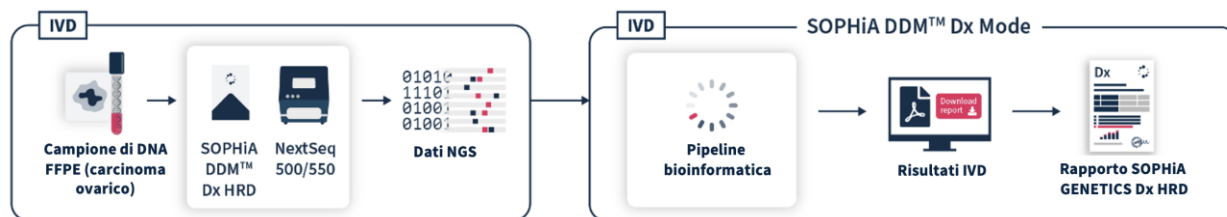


Figura 1. Panoramica dei diversi componenti della soluzione SOPHiA DDM™ Dx HRD



4. SOPHiA DDM™ DX MODE

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

Per accedere alla piattaforma per la prima volta, è necessario registrarsi. Sarà richiesto di:

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

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



5. MATERIALI E METODI DEL KIT

5.1. Considerazioni iniziali

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

5.1.1. Contenuto del kit (32 campioni)

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

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

- Universal Blockers - TS Mix (12 µl)
- Human Cot DNA (25 µl)
- HRD_v1 probes by SOPHiA GENETICS (18 µl)
- 2x Hybridization Buffer (75 µl)
- Hybridization Buffer Enhancer (30 µl)
- 2x Bead Wash Buffer (1250 µl)
- 10x Stringent Wash Buffer (200 µl)
- 10x Wash Buffer I (160 µl)
- 10x Wash Buffer II (110 µl)
- 10x Wash Buffer III (110 µl)
- 32 Illumina®-compatible Unique Dual Index Primers V2 in a 96-well plate format (7 µl each): see Appendix II for primers display and sequences.
- Post Capture Illumina® Primers Mix (20 µl)
- PCR Enhancer (20 µl)
- Post Capture PCR Master Mix (122 µl)
- Stubby Universal Adapter (220 µl)

[†] La stabilità dei reagenti congelati nel Box 1 è garantita per un massimo di 4 cicli di congelamento e scongelamento prima dell'uso.



BOX 2 (CONSERVARE TRA +2 °C E +8 °C)

- Dynabeads® M-270 Streptavidin (440 µl)
- Agencourt® AMPure® XP (8.7 ml)
- IDTE Low TE Buffer (10 ml)
- Nuclease-free water (20 ml)

SOPHiA GENETICS™ Dx DNA Library Prep Kit III* (CONSERVARE TRA -25°C E -15°C)†

- PCR Master Mix 2x (520 µl x 2)
- Fragmentation Buffer (77 µl x 2)
- Fragmentation Enzyme Mix (116 µl x 2)
- Ligation Mix (836 µl x 2)
- Ligation Enhancer (87 µl x 2)

* Per 32 campioni vengono forniti due kit da 16 campioni.

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

† La stabilità dei reagenti congelati nel SOPHiA GENETICS™ Dx DNA Library Prep Kit III è garantita per un massimo di 2 cicli di congelamento e scongelamento prima dell'uso.



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



AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Nome del prodotto	GHS Pittogramma	Frasi H e P	Parole di segnalazione	Componente pericoloso
2X Tampone di ibridazione		• H300 Letale se ingerito. • H311 Tossico per contatto con la pelle. • H315 Provoca irritazione cutanea. • H370 Provoca danni agli organi. • H370 Provoca danni agli organi (sistema nervoso centrale). • H411 Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. • P260 Non respirare i vapori/gli aerosol. • P264 Lavare accuratamente la pelle contaminata dopo la manipolazione. • P270 Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso. • P273 Non disperdere nell'ambiente. • P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. • P301+P310 In caso di ingestione: contattare immediatamente un centro antiveneni/un medico. • P302+P352 In caso di contatto con la pelle: lavare abbondantemente con acqua. • P308+P311 In caso di esposizione o di possibile esposizione: Chiamare un centro antiveneni o un medico. • P321 Trattamento specifico (vedere il consiglio medico su questa etichetta). • P330 Sciacquare la bocca. • P332+P313 In caso di irritazione della pelle: consultare un medico. • P362+P364 Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. • P391 Raccogliere il materiale fuoriuscito. • P405 Conservare sotto chiave. • P501 Smaltire il contenuto/contenitore in	Pericolo	Cloruro di ammonio tetrametilico Concentrazione: 49% CAS: 75-57-0



Nome del prodotto	GHS Pittogramma	Frase H e P	Parole di segnalazione	Componente pericoloso
Potenziatore per tamponi di ibridazione		conformità alle normative nazionali. • H351 Sospettato di causare il cancro. • H360 Può nuocere alla fertilità o al nascituro. • H373 Può causare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta. • P201 Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso. • P202 Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze. • P260 Non respirare i vapori/gli aerosol. • P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. • P308+P313 In caso di esposizione o di possibile esposizione: consultare un medico. • P314 In caso di malessere, consultare un medico. • P405 Conservare sotto chiave. • P501 Smaltire il contenuto/contenitore in conformità alle normative nazionali.	Pericolo	Formammide Concentrazione: 100% CAS: 75-12-7
10x tampone di lavaggio stringente		• H302 Nocivo se ingerito. • H315 Provoca irritazione cutanea. • H319 Provoca grave irritazione oculare.	Pericolo	Sale sodico dell'acido etilendiamminetetracetico Concentrazione: 2,5% CAS: 6381-92-6
10x tampone di lavaggio I		• H228 Solido infiammabile. • H302 Nocivo se ingerito. • H315 Provoca irritazione cutanea. • H318 Provoca gravi lesioni oculari. • H332 Nocivo se inalato. • H401 Tossico per gli organismi acquatici. • H402 Nocivo per gli organismi acquatici. • H412 Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. • P273 Non disperdere nell'ambiente.	Pericolo	Dodecilsolfato sodico Concentrazione: 4,9% CAS: 151-21-3



Nome del prodotto	GHS Pittogramma	Frasi H e P	Parole di segnalazione	Componente pericoloso
		• P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. • P305+P351+P338 In caso di contatto con gli occhi: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. • P310 Chiamare immediatamente un centro antiveneni/un medico. • P501 Smaltire il contenuto/contenitore in conformità alle normative nazionali.		
Fragmentation Buffer		• H302 - Nocivo se ingerito. • H370 - Provoca danni agli organi. • H412 - Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. • P273 - Non disperdere nell'ambiente. • P260 - Non respirare i vapori. • P270 - Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso. • P264 - Sciacquarsi accuratamente dopo il contatto con il prodotto. • P308 + P311 IN CASO DI esposizione: Chiamare un CENTRO ANTIVENENI o un medico. • P301 + P312, P330 SE INGERITO: Chiamare un CENTRO ANTIVENENI o un medico in caso di malessere. Sciacquare la bocca. • P405 Conservare sotto chiave. • P501 - Smaltire il contenuto e il contenitore in conformità a tutte le normative locali, regionali, nazionali e internazionali.	Pericolo	Tetrametilammonio cloruro Concentrazione: 1%-3% CAS: 75-57-0

Usare  e  come dispositivo di protezione individuale.



5.1.2. Materiale richiesto (non fornito)

MATERIALI FORNITI DALL'UTENTE (DA ACQUISTARE SEPARATAMENTE)

- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml
- Provette a basso legame con il DNA da 1,5 ml
- Provette da 1,5 ml
- Provette coniche da 50 ml
- Punte filtro
- Etanolo (grado biologia molecolare)
- Reagenti per il sequenziamento Illumina®.

ATTREZZATURA DA LABORATORIO

Per qualificare i campioni: Sistema Agilent Fragment Analyzer™

Per evitare la contaminazione del campione:

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



5.2. Preparazione libreria

5.2.1. Preparazione del DNA

MATERIALI

- DNA estratto da tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (DNA FFPE)
- IDTE
- Acqua senza nucleasi
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

IMPORTANTE



La soluzione SOPHiA DDM™ Dx HRD è destinata a campioni con un contenuto tumorale di almeno il 30%. L'elaborazione di DNA da campioni con un contenuto di tessuto tumorale inferiore al 30% non è compatibile con la soluzione.

La qualità del DNA estratto da FFPE è variabile e potrebbe influenzare i dati di sequenziamento. L'esposizione alla formalina danneggia l'integrità della molecola generando la frammentazione del DNA. Induce anche artefatti di sequenziamento dovuti a eventi di deaminazione.

L'integrità dell'DNA dei campioni FFPE deve essere valutata prima dell'esperimento utilizzando l'elettroforesi capillare ad alta risoluzione su Fragment Analyzer (Agilent).

Valutazione della qualità del DNA: analizzare 5-10 ng di DNA genomico su Agilent Fragment Analyzer™ System utilizzando il kit HS large fragment 50 kb (DNF-464-0500). La qualità del DNA genomico viene valutata con il numero di qualità del DNA (DQN). Impostare la soglia per il DQN a 375 bp ed estrarre il DQN per i campioni di DNA.



Importante: L'elaborazione di un campione senza misurare il DQN o con un DQN inferiore a 3 può portare a una resa non ottimale della preparazione della libreria del genoma intero e a una qualità insufficiente dei dati NGS, con possibili risultati inconsistenti (vedere la sezione Avvertenze e limitazioni).

A seconda della qualità del DNA, regolare il protocollo in base alla *Tabella 1* a pagina 19.

Tabella 1. Quantità raccomandate di DNA da utilizzare come input in base alla qualità dello stesso

RACCOMANDAZIONI DI INPUT BASATE SULLA QUALITÀ DEL DNA			
Qualità del DNA	DQN < 3 Meno del 30% dei frammenti di DNA di dimensioni superiori a 375 bp	3 ≤ DQN ≤ 5 30% - 50% dei frammenti di DNA più grandi di 375 bp	5 < DQN ≤ 10 Più del 50% dei frammenti di DNA di dimensioni superiori a 375 bp
Quantità di DNA (ng)	Non elaborare il campione	100 ng*	50 ng

*Se non è possibile utilizzare 100 ng di materiale di input a causa di quantità insufficienti di materiale di partenza, si consiglia di utilizzare 50 ng di materiale di input e aumentare il numero di cicli di PCR a 10 cicli di PCR nel passaggio 5.2.6 per ottenere una resa sufficiente della libreria.



Per evitare errori nell'input del DNA, si raccomanda una diluizione iniziale per ottenere una concentrazione compresa tra 10 e 20 ng/μl. La concentrazione di DNA deve essere confermata da una quantificazione fluorimetrica (ad esempio, Qubit®, Thermo Fisher) e il valore ottenuto deve essere utilizzato per calcolare la diluizione finale.

PROCEDURA

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

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

2. Preparare una diluizione per ciascun campione di DNA estratto nel numero appropriato di strisce PCR come segue:

DILUIZIONE DNA	
DNA	Quantità di DNA (cfr. <i>Tabella 1</i> a pagina 19)
IDTE	Completare a 40 μl

3. 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.

5.2.2. Preparazione dei pre-mix e dei reagenti

COMPONENTI E REAGENTI

- Fragmentation Enzyme Mix
- Fragmentation Buffer
- Potenziatore di legatura
- Mix legatura
- PCR Master Mix 2x
- Acqua senza nucleasi
- Sfere AMPure® XP
- Etanolo

PREPARAZIONE

- Rimuovere i componenti di SOPHiA GENETICS™ Dx DNA Library Prep Kit III dalla conservazione a -20°C e scongelarli sul ghiaccio.
- Rimuovere le sfere AMPure® XP dal luogo di conservazione a 2-8 °C e lasciarle acclimatare alla temperatura ambiente per almeno 30 minuti. Vorticare accuratamente le sfere AMPure® XP, per garantire una corretta risospensione delle stesse, prima di utilizzarle in tutte le fasi successive.
- Preparare l'etanolo all'80% (volume secondo il seguente schema in base al numero di reazioni):



80% ETANOLO				
Numero di reazioni	8	16	24	32
80% Etanolo (in ml)	10	20	30	40

- Assicurarsi che il Fragmentation Buffer del kit di SOPHiA GENETICS™ Dx DNA Library Prep Kit III sia completamente scongelato.
- Mescolare bene e centrifugare tutti i reagenti prima dell'uso e metterli nel ghiaccio.

PRE-MIX

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

PRE-MIX DI FRAMMENTAZIONE				
Numero di reazioni	8	16	24	32
Fragmentation Buffer (in µl)	38,4	76,8	115,2	153,6
Enzima di frammentazione (in µl)	57,6	115,2	172,8	230,4

- Tenere sul ghiaccio.

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

PRE-MIX DI LEGATURA				
Numero di reazioni	8	16	24	32
Mix di legatura (in µl)	418	836	1254	1672
Potenziatore di legatura (in µl)	14,4	28,8	43,2	57,6

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



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



5.2.3. Frammentazione enzimatica, riparazione finale e A-tailing

MATERIALI

- DNA a doppio filamento diluito in 40 µl
- Pre-mix di frammentazione
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

PREPARAZIONE

- Programmare il termociclatore per la frammentazione con le seguenti impostazioni:

	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (IN MINUTI)
Coperchio	99	
Passaggio 1	4	1
Passaggio 2	37	20
Passaggio 3	65	30
Mantenere	4	∞

Avviare il programma di frammentazione. Quando il blocco raggiunge il passaggio 1 (4 °C), mettere in pausa il programma.

PROCEDURA



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

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

NUMERO DI REAZIONI	8	16	24	32
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Pre-mix di frammentazione (in µl)	23	23	35	46

2. Assemblare la reazione come segue:
 - Utilizzando una pipetta multicanale, aggiungere 10 µl di pre-mix di frammentazione a ciascuno dei 40 µl di campioni di DNA FFPE (totale di 50 µl in strisce da 4 o 8 provette).
 - Usando una pipetta multicanale impostata su 35 µl, mescolare attentamente pipettando su e giù 5 volte e centrifugare brevemente in una microcentrifuga.

3. Mettere nel termociclatore e continuare il programma di frammentazione.

Procedere immediatamente alla legatura.



5.2.4. Legatura

MATERIALI

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

PREPARAZIONE

- Durante la frammentazione, preparare nuove strisce PCR con 5 µl di adattatore universale Stubby per ciascuna provetta, secondo lo schema seguente:

NUMERO DI REAZIONI	8	16	24	32
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Numero di strisce	2	2	3	4

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

PROCEDURA



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

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

NUMERO DI REAZIONI	8	16	24	32
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Pre-mix legatura (in µl)	100	100	150	200

2. Usando una pipetta multicanale, trasferire 50 µl di ciascun prodotto di reazione della frammentazione alle strisce da 4 o 8 provette contenenti 5 µl di adattatori universali Stubby.
3. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
4. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 45 µl di pre-mix di legatura a ciascun prodotto di reazione della frammentazione (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).

Procedere alla pulizia post legatura.



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



5.2.5. Pulizia post-legatura

MATERIALI

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

PROCEDURA

1. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 80 µl di sfere AMPure® XP ogni 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, se necessario.
3. Posizionare le strisce da 4 o 8 provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
4. Eliminare accuratamente 170 µl del surnatante usando una pipetta multicanale.

Tenere le provette sul rack magnetico per i passaggi successivi.

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

Rimuovere le provette dal rack magnetico.

10. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 20 µl di IDTE alle sfere.

Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.

Procedere all'amplificazione della libreria.



5.2.6. Amplificazione della libreria

MATERIALI

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

PREPARAZIONE

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

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

PROCEDURA

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

NUMERO DI REAZIONI	8	16	24	32
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette
PCR Master Mix 2x (in µl)	60	60	85	120

2. Assemblare la reazione come segue:
 - Utilizzando una pipetta multicanale, aggiungere 5 µl di un primer per doppi indici univoci diverso per provetta ai prodotti di ligazione e alle sfere, in base alla strategia di indicizzazione.
 - Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.



- Con una pipetta multicanale, aggiungere 25 µl di PCR Master Mix 2x ai prodotti di legatura e alle sfere (50 µl in strisce da 4 o 8 provette). Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
3. Mettere le provette nel termociclatore ed eseguire il programma Amplificazione della libreria.



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

5.2.7. Pulizia post-amplificazione

MATERIALI

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

PROCEDURA

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

Tenere le provette sul rack magnetico per i passaggi successivi.

5. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 170 µl di etanolo all'80% alle sfere. Lasciar riposare le provette da 30 secondi a 1 minuto.
6. Eliminare accuratamente l'etanolo usando una pipetta multicanale.
7. Ripetere i passaggi 5 e 6 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 30 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 brevemente, se necessario.



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 28 µl di surnatante in una nuova provetta etichettata per la conservazione della libreria.



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

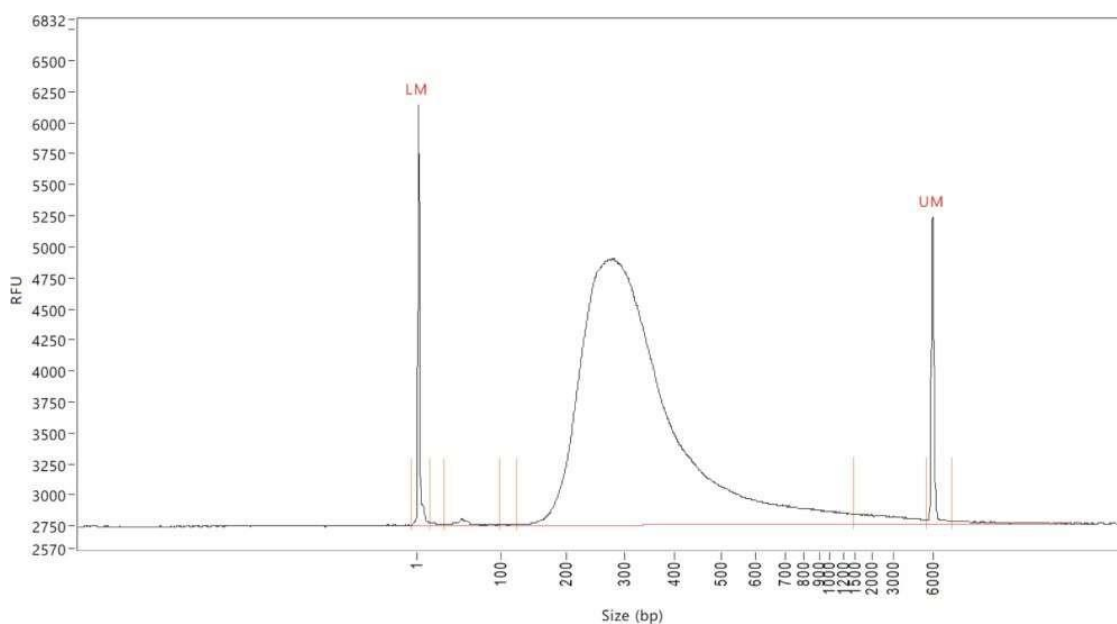
5.2.8. Quantificazione individuale della libreria e controllo qualità

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

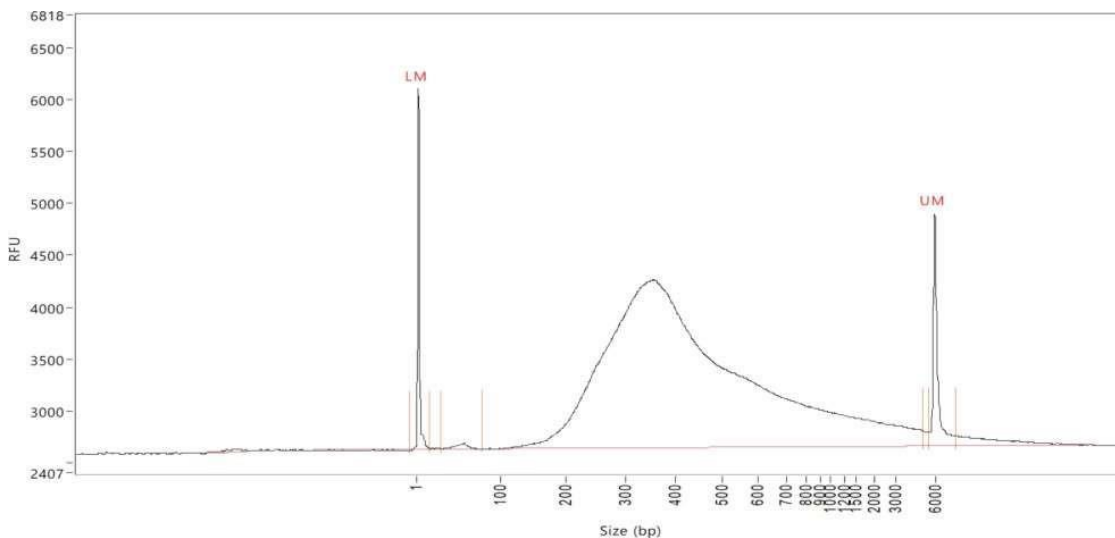
PROCEDURA

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 200 bp e 800 bp.





Esempio di distribuzione della libreria di DNA ottenuta con sistema di elettroforesi capillare Agilent Fragment Analyzer™. LM si riferisce al marcatore inferiore, UM al marcatore superiore.



Esempio di distribuzione della libreria di DNA ottenuta con sistema di elettroforesi capillare Agilent Fragment Analyzer™. LM si riferisce al marcatore inferiore, UM al marcatore superiore.

5.2.9. Pooling delle librerie per il sequenziamento dell'intero genoma (WGS) low-pass

MATERIALI

- Librerie individuali
- IDTE
- Provette a basso legame con il DNA da 1,5 ml

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 5.2.8 come segue:

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

2. Trasferire 2 μl di ciascuna libreria singolarmente in una nuova provetta e diluire a 10 nM con IDTE.
3. Mettere in pool le singole librerie a 10 nM combinando 5 μl da ogni diluizione delle librerie. Combinare le stesse librerie in un pool che verrà poi combinato nel pool di acquisizione. Durante l'elaborazione di più acquisizioni, creare un numero di pool WGS pari a quello dei pool di acquisizione.

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



5.3. Cattura

5.3.1. Pooling della libreria per ibridazione e cattura

MATERIALI

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

PROCEDURA

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

NUMERO DI CATTURE	1	2	3	4
Human Cot DNA (in μ l)	5	11	16,5	22
Universal Blockers – TS Mix (in μ l)	2	4,4	6,6	8,8

2. Se si stanno eseguendo due o più catture, pipettare 7 μ l del pre-mix precedente in singole provette a basso legame con il DNA.
3. Aggiungere un pool di 8 librerie individuali utilizzando 200 ng di ciascuna (per un totale di 1600 ng) per ogni cattura nelle singole provette contenenti il pre-mix sopra indicato.
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.

5.3.2. Ibridazione

MATERIALI

- Librerie liofilizzate
- 2X tampone di ibridazione
- Potenziatore per tamponi di ibridazione
- Sonda HRD_v1
- Acqua senza nucleasi
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml
- Provette da 1,5 ml
- 10X tampone di lavaggio I
- 10X tampone di lavaggio II
- 10X tampone di lavaggio III
- 10X tampone di lavaggio stringente
- 2X tampone di lavaggio sfere



PREPARAZIONE

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



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

PROCEDURA

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

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

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



Importante: Non lasciare che la temperatura della provetta scenda sotto i 65 °C dal punto 4 al punto 6: questo può portare a un annealing errato della sonda.

5. Spostare la provetta PCR dal termociclatore da 95 °C a 65 °C, quindi aggiungere 4 µl di sonde al mix. Usando una pipetta impostata a 13 µl, mescolare accuratamente pipettando su e giù per 5 volte.
6. Incubare nel termociclatore a 65 °C per 4 - 16 ore.
7. Preparare in anticipo 1x soluzioni di lavoro dei diversi tamponi di lavaggio come descritto nelle pagine seguenti per permettere loro di raggiungere l'equilibrio durante la reazione di ibridazione.

PREPARAZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO PER 1 REAZIONE

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



Importante: Preriscaldare 1x tampone stringente e un'aliquota di 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.

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

PROCEDURA

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

1. Miscelare le sfere a vortice per 15 secondi.
2. Trasferire 100 μ l di sfere per cattura (200 μ l per 2 reazioni, 300 μ l per 3 reazioni, 400 μ l 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 μ l di 1x tampone di lavaggio sfere per cattura (400 μ l per 2 reazioni, 600 μ l per 3 reazioni, 800 μ l 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 μ l di 1x tampone di lavaggio sfere per cattura (200 μ l per 2 reazioni, 300 μ l per 3 reazioni, 400 μ l per 4 reazioni) alla provetta. Agitare per 10 secondi.
8. Trasferire 100 μ l 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 rimanga vicino a 65 °C.

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

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

5.3.5. 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



Assicurarsi che la temperatura rimanga vicina ai 65°C per le fasi da 1 a 7.

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

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

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



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

5. Incubare a 65 °C per 5 minuti.
6. Posizionare la provetta su un rack magnetico e lasciarla riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
7. Ripetere i passaggi da 4 a 6 una volta.

Lavorare a temperatura ambiente.

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

Nota: se si lavora con 2 o più provette di cattura, da questo passaggio in avanti, processare tutte le provette contemporaneamente.

9. Agitare per 2 minuti.



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

5.3.6. Amplificazione post-cattura

MATERIALI

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

PREPARAZIONE

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



	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (IN SECONDI)	
Coperchio	99	-	15 cicli
Passaggio 1: Denaturazione iniziale	98	120	
Passaggio 2: Denaturazione	98	20	
Passaggio 3: Annealing	60	30	
Passaggio 4: Estensione	72	30	
Passaggio 5: Estensione finale	72	60	
Mantenere	10	∞	

PROCEDURA

1. Preparare il pre-mix PCR come segue:

PRE-MIX PCR				
Numero di reazioni	1	2	3	4
Master Mix PCR post-cattura 2X (in µl)	25	55	82,5	110
Mix di primer Illumina® post-cattura (in µl)	2,5	5,5	8,25	11
Potenziatore PCR (in µl)	2,5	5,5	8,25	11

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



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

5.3.7. 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, se necessario, centrifugare brevemente per rimuovere il liquido dalle pareti della provetta.
3. Posizionare le provette su un rack magnetico per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
4. Eliminare accuratamente 90 µl del surnatante usando una pipetta multicanale.

Tenere le provette sul rack magnetico per i passaggi successivi.

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

Rimuovere le provette dal rack magnetico.

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



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

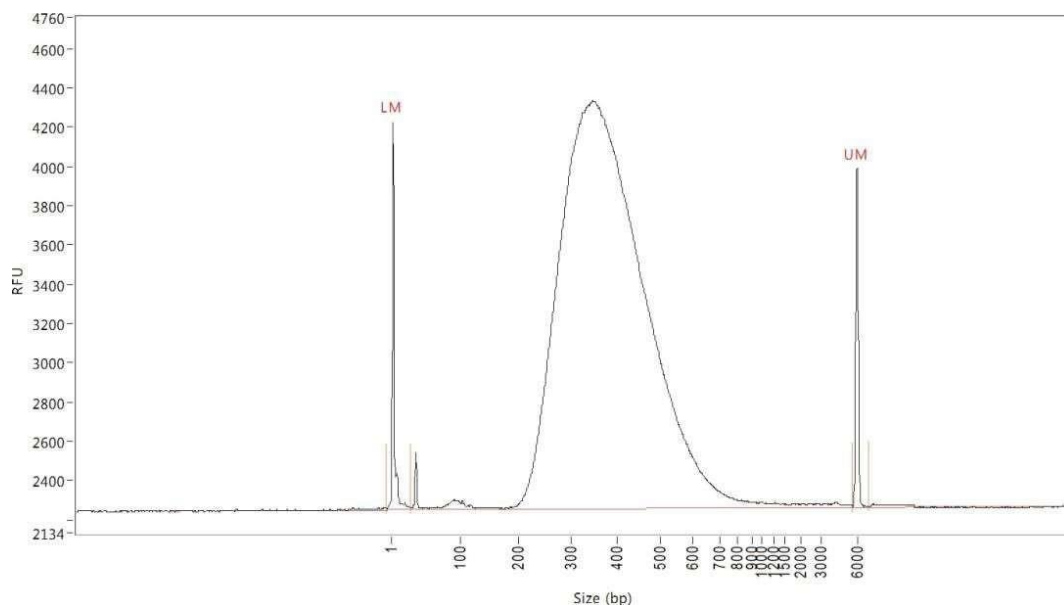
5.3.8. Quantificazione finale della libreria e controllo qualità

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 200 bp e 800 bp.



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

5.4. Sequenziamento

5.4.1. Preparazione della libreria per il sequenziamento

MATERIALI

- Kit di sequenziamento Illumina® NextSeq®
- Librerie finali catturate
- Tampone EBT o simile

PROCEDURA

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

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

2. Diluire ciascun pool catturato a 10 nM.
3. Far scongelare il pool WGS generato al punto 5.3.1.
4. Per generare il pool di sequenziamento, combinare ciascun pool di cattura con il corrispondente pool WGS mescolando 3,3 μl di pool di cattura con 6,7 μl di pool WGS.



5. Se si elaborano più pool di sequenziamento, mescolarli in quantità uguali (ad esempio, 5 µl di ciascuno) seguendo la tabella delle raccomandazioni di sequenziamento riportata di seguito:

TIPO DI KIT NEXTSEQ 500/ 550 SYSTEM	NUMERO DI CAMPIONI PER STUDIO
Mid-Output	8 campioni (1 pool)
High-Output	24 campioni (3 pool)

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

TIPO DI KIT NEXTSEQ 500/550 SYSTEM	DILUIZIONE DEL DOSAGGIO
Mid-Output	1,3 pM
High-Output	1,4 pM
[Regolare la diluizione (intervallo da 1,1 pM a 1,5 pM) in base al numero di cluster ottenuti nel primo studio]	

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

LUNGHEZZA DELLA LETTURA (IN BP)	LETTURE TOTALI RACCOMANDATE PER CAMPIONE	COPPIE DI LETTURE (FRAMMENTI) RACCOMANDATE PER CAMPIONE
2 X 150	32 milioni	16 milioni

Nota: Si prevede che l'aumento del numero di letture per campione fornisca chiamate di varianti più sicure e sensibili, soprattutto nelle regioni con una profondità di lettura altrimenti relativamente bassa. Consultare la sezione 9. *Avvertenze, limitazioni e precauzioni*.



6. PROCEDURA DI ANALISI

6.1. Demultiplexing dei dati NGS

L'utente deve eseguire il demultiplexing dei dati NGS seguendo le istruzioni fornite dal manuale d'uso del sequenziatore Illumina® NextSeq® 500/550 (ad esempio, NextSeq® 550 Systems Guide, documento n. 15069765 v07). Come indicato da Illumina®, il demultiplexing autonomo per le analisi di terze parti può essere eseguito con bcl2fastq v2.0 o superiore (bcl2fastq2 Conversion Software v2.20 Software Guide, Documento n. 15051736 v03).



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

6.2. Caricamento e analisi dei dati

L'utente accede alla modalità SOPHiA DDM™ Dx e seleziona la SOPHiA DDM™ Dx Homologous Recombination Deficiency Solution nella finestra "I miei prodotti", per avviare il caricamento dei dati NGS. Per creare una nuova richiesta di analisi genomica, consultare la sezione "Creare una richiesta di analisi" nel manuale d'uso della modalità SOPHiA DDM™ Dx per IVD. Al termine dell'analisi, gli utenti riceveranno una notifica via e-mail. Se non si riceve una notifica entro 24 ore dall'inizio del processo di caricamento dei dati, è necessario contattare l'assistenza.



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

6.3. Generazione di report

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



CE-IVD Report
 2022, Mar 18

SOPHiA DDM Dx Homologous Recombination Deficiency Solution Report

Patient ID
patient1

Sample ID
HRD-70

// Homologous Recombination Deficiency

SOPHiA DDM Dx HRD status
POSITIVE

// Genomic Integrity

Genomic Integrity Status
Positive

Genomic Integrity Index
16.6

Genomic Integrity QA Status
High

// Analysis

Request name
Trial

CE-IVD Product
SOPHiA DDM Dx Homologous Recombination Deficiency Solution

SOPHiA DDM Dx version
0.0.0

Signature _____

// Intended purpose

The SOPHiA DDM Dx Homologous Recombination Deficiency Solution is an in vitro diagnostic medical device that can be used as an aid to determine the Homologous Recombination Deficiency (HRD) status of tumors in patients with ovarian cancer by the semi-quantitative detection of the Genomic Instability biomarker. The device is intended to be used by healthcare professionals and is based on a next generation sequencing (NGS) workflow taking genomic DNA extracted from FFPE treated tumor material as input.

Request number: 12345 Patient ID: patient1
 Report date: 2022, Mar 18 10:00:12 Sample ID: HRD-70

1 / 1

Figura 2. Esempio di report SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution.

Il report SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution visualizza: lo stato SOPHiA DDM™ Dx HRD, lo stato dell'integrità genomica, l'indice di integrità genomica e lo stato QA dell'integrità genomica. La Tabella 2 a pagina 42 fornisce una panoramica dei possibili risultati.



Tabella 2. SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution riporta i possibili risultati

Stato di SOPHiA DDM™ Dx HRD	Stato dell'integrità genomica	Stato QA dell'integrità genomica	Descrizione
Positive	Positive	High	Chiamata positiva ad alta confidenza.
Positive	Positive	Medium	Chiamata positiva ad alta confidenza. I dati NGS soddisfano i criteri di qualità necessari per considerare un campione positivo. Tuttavia, i dati NGS sono di qualità non ottimale e/o il contenuto tumorale del campione è basso.
Negative	Negative	High	Chiamata negativa ad alta confidenza.
Negative	Negative	Medium	Chiamata negativa ad alta confidenza. I dati NGS soddisfano i criteri di qualità necessari per considerare un campione negativo. Tuttavia, i dati NGS sono di qualità non ottimale e/o il contenuto tumorale del campione è basso.
Negative	Negative*	Medium	Chiamata negativa a media confidenza con un maggiore rischio di falsi negativi. I dati NGS non soddisfano i criteri di qualità necessari per considerare un campione negativo con un'alta affidabilità. Il rapporto segnale/rumore nei dati NGS è basso, forse a causa dell'insufficiente contenuto tumorale del campione. Si raccomanda di verificare che il campione di DNA soddisfi i requisiti di contenuto tumorale e di qualità del DNA.
Indeterminato	Inconclusive	Medium	Lo stato SOPHiA DDM™ Dx HRD non può essere determinato a causa dell'insufficiente rapporto segnale/rumore nei dati NGS utilizzati per l'analisi dell'integrità genomica. Questo risultato può riflettere l'assenza di grandi alterazioni del numero di copie nel campione o un contenuto tumorale insufficiente. Si consiglia di ripetere l'esperimento con un nuovo campione di DNA e di assicurarsi che il contenuto di tessuto tumorale e la qualità siano sufficienti.
Indeterminato	Rejected	Low	Lo stato SOPHiA DDM™ Dx HRD non può essere determinato a causa della qualità insufficiente dei dati NGS utilizzati per l'analisi dell'integrità genomica. Si consiglia di ripetere l'esperimento assicurandosi che il contenuto tumorale del campione e la qualità del DNA siano sufficienti e che vengano seguite le istruzioni del protocollo.



7. DESCRIZIONE DELL'ANALISI E PARAMETRI

7.1. File delle risorse

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

genoma di riferimento GRCh37 - hg19:

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

7.2. Pre-elaborazione dei dati grezzi

Pre-elaborazione

- Raccogliere metriche di qualità basate sui file fastq grezzi.
- Ridurre i file fastq a una dimensione massima di 2500 MB.

Allineamento

- Eliminare gli adattatori e le estremità di bassa qualità dalle letture (qualità di base inferiore a 20).
- Allineare le letture al genoma di riferimento hg19 in modalità paired-end.
- Calcolare le statistiche di allineamento e le metriche di copertura sui file di allineamento grezzi.
- Refinire le sequenze di adattatori eccedenti.

7.3. Analisi dell'integrità genomica

L'analisi dell'integrità genomica mira a rilevare la HRD valutando il grado di instabilità genomica. La riparazione funzionale della ricombinazione omologa è necessaria per la riparazione senza errori delle rotture del doppio filamento e per il mantenimento dell'integrità del genoma. Una conseguenza della HRD è la perdita dell'integrità genomica attraverso l'accumulo di anomalie genomiche dovute all'incapacità della cellula di riparare le rotture del doppio filamento. La nostra analisi dell'integrità genomica mira a valutare queste anomalie genomiche attraverso l'uso del sequenziamento dell'intero genoma (WGS). In particolare, il nostro metodo utilizza un algoritmo di apprendimento profondo che è stato specificamente addestrato per riconoscere i modelli di instabilità genomica nel profilo di copertura WGS. L'algoritmo analizza i dati WGS di tipo low-pass (lpWGS) e produce un indice di integrità genomica (GI) che ne riflette il livello. Un indice GI superiore a 0 indica una bassa integrità genomica. Un indice GI inferiore a 0 indica un'elevata integrità genomica.

Durante l'analisi del GI vengono eseguite in sequenza le seguenti fasi algoritmiche per ciascun campione di interesse: prima i dati WGS low-pass (lpWGS) vengono pre-elaborati e sottoposti a valutazione della qualità, poi viene calcolato l'indice GI e infine viene assegnato uno stato GI al campione. Queste fasi sono descritte nelle sezioni seguenti.



Passaggio 1: pre-elaborazione dei dati e valutazione della qualità del campione:

1. Le letture WGS paired-end sono mappate sul genoma umano di riferimento ed elaborate per escludere gli adattatori e le chiamate di basi di bassa qualità. Il profilo di copertura WGS viene calcolato e normalizzato.
2. Il profilo di copertura WGS normalizzato viene sottoposto a un controllo di qualità basato sulle metriche definite alla fine di questa sezione. Al campione viene assegnato uno dei seguenti stati di qualità GI:
 - **Alta qualità:** la qualità dei dati è sufficiente per calcolare con sicurezza un indice GI e uno stato GI.
 - **Qualità media:** la qualità dei dati è inferiore (rispetto alla qualità alta) e, di conseguenza, l'algoritmo di deep learning potrebbe non riuscire a calcolare un indice GI.
 - **Bassa qualità:** la qualità dei dati non soddisfa i criteri necessari per calcolare un indice GI.

Passaggio 2: Calcolo dell'indice GI:

L'indice GI si ottiene elaborando il profilo di copertura WGS normalizzato con un algoritmo proprietario di deep learning formulato per riconoscere i modelli di instabilità genomica.

Passaggio 3: Determinazione dello stato GI:

Lo stato GI che si applica ai campioni di cancro ovarico è determinato dalla combinazione dello stato di qualità del campione e dell'indice GI. Sono possibili cinque risultati:

- **GI positive:** campioni con indice GI maggiore o uguale a 0.
- **GI negative:** campioni con indice GI inferiore a 0.
- **GI negative*:** campioni con un indice GI inferiore a 0 ma con un rischio maggiore di chiamate false negative a causa del basso rapporto segnale/rumore.
- **GI inconclusive:** campioni di qualità media per i quali l'algoritmo di deep learning non è riuscito a calcolare un indice GI a causa di un rapporto segnale/rumore insufficiente.
- **GI rejected:** campioni di bassa qualità scartati dall'analisi del GI. I campioni vengono rifiutati se il numero di frammenti di DNA disponibili per il calcolo del profilo di copertura WGS è insufficiente, se il rumore del profilo di copertura WGS è eccessivo o se la percentuale di valori anomali di copertura è eccessiva.

Definizione delle metriche di controllo qualità e di GI

- **N. totale di frammenti:** numero totale di frammenti di DNA (letture paired-end) correttamente mappati.
- **Numero Frammenti WGS:** numero totale di frammenti di DNA disponibili per il calcolo del profilo WGS a copertura grezza. Sono stati esclusi i frammenti di DNA che si trovano nelle regioni genomiche favorite per la chiamata di varianti. Questo parametro viene confrontato con una soglia di 4 milioni per determinare lo stato QA del GI.
- **Percentuale di frammenti WGS:** frazione del numero totale di frammenti WGS sul numero totale di frammenti.
- **Percentuale di valori anomali di copertura:** percentuale di regioni WGS considerate per l'analisi GI che presentano una copertura localizzata artefatta ed eccessiva, compensata dall'algoritmo di normalizzazione della copertura. Questo parametro viene confrontato con una soglia del 20% per determinare lo stato QA del GI.
- **Rapporto purezza/ploidia:** rapporto tra il contenuto tumorale del campione e la sua ploidia, stimato misurando la forza del segnale indotto nel profilo di copertura WGS normalizzato da una variazione del numero di copie.



Questo parametro viene confrontato con una soglia di 0,1 (che suggerisce un basso contenuto di tumori) per determinare lo stato QA del GI. L'impossibilità di misurare il rapporto purezza-ploidia dai dati viene utilizzata anche per determinare lo stato QA del GI.

- **Rumore residuo:** il rumore residuo viene calcolato misurando la deviazione standard del profilo di copertura WGS normalizzato rispetto al profilo di copertura WGS attenuato. Questo parametro viene confrontato con una soglia di 0,17 per determinare lo stato QA del GI.
- **SNR:** Forza del segnale indotto nel profilo di copertura WGS normalizzato da tutte le anomalie del numero di copie presenti nel campione diviso per il rumore residuo. Questo parametro viene confrontato con una soglia di 0,55 per determinare lo stato QA del GI. L'algoritmo considera anche l'SNR per assegnare lo stato GI Negative* e GI Inconclusive.
- **Stato QA:** stato di valutazione della qualità del GI di un campione.
- **Indice GI:** l'indice GI è un valore scalare, compreso tra -20 e 20, che riflette il livello di integrità genomica. Indici GI elevati riflettono bassi livelli di integrità genomica. Bassi indici GI riflettono alti livelli di integrità genomica.
- **Stato GI:** Lo stato di integrità genomica di un campione.

7.4. Calcolo dello stato di SOPHiA DDM™ Dx HRD

La pipeline bioinformatica calcola lo stato SOPHiA DDM™ Dx HRD in base allo stato di integrità genomica secondo la seguente tabella.

Stato dell'integrità genomica	Stato di SOPHiA DDM™ Dx HRD
Positive	Positive
Negative	Negative
Negative*	Negative
Inconclusive	Indeterminato
Rejected	Indeterminato



8. VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI

8.1. Valutazione delle prestazioni analitiche

8.1.1. Concordanza dello stato di integrità genomica con l'analisi NGS di confronto

Le prestazioni analitiche dello stato di integrità genomica sono state valutate su 238 campioni di DNA estratti da campioni FFPE di cancro ovarico con DQN $\geq$ 3, sequenziati su Illumina® NextSeq® 550, per i quali è stato ottenuto un risultato conclusivo di instabilità genomica con l'analisi NGS di confronto.

Dei 238 campioni inclusi nell'analisi, 5 hanno dato luogo a uno stato di integrità genomica incoerente (tasso di rifiuto: 2,1%). La tabella seguente mostra le prestazioni calcolate sui restanti 233 campioni per i quali è stato ottenuto uno stato di integrità genomica conclusivo.

Parametro	Valore
Percentuale di accordo positivo (PPA)	92,9%
Percentuale di accordo negativo (NPA)	95,8%
Percentuale di accordo complessiva (OPA)	94,4%

8.1.2. Stato di integrità genomica Limite di rilevamento del contenuto tumorale del campione

Il limite di rilevamento per lo stato di integrità genomica rispetto al contenuto tumorale del campione è stato stabilito misurando il contenuto tumorale più basso per il quale la sensibilità è maggiore o uguale al 95%. Il limite di rilevamento è risultato pari al 28,5% del contenuto tumorale.

8.1.3. Ripetibilità dello stato di integrità genomica

La ripetibilità dello stato di integrità genomica è stata stabilita in base ai risultati ottenuti in esperimenti indipendenti eseguiti con più campioni.

Caratteristica	Ripetibilità dello stato GI	Deviazione standard dell'indice GI (media/intervallo tra i campioni)
Ripetibilità	100%	0,26/[0,23 - 0,32]



8.1.4. Riproducibilità dello stato di integrità genomica

La riproducibilità dello stato di integrità genomica è stata stabilita in base ai risultati ottenuti da laboratori indipendenti a cui sono state fornite unità degli stessi campioni di riferimento.

Caratteristica	Riproducibilità dello stato GI	Deviazione standard dell'indice GI (media/intervallo tra i campioni)
Riproducibilità tra gli studi	100%	0,47/[0,00-1,48]
Riproducibilità tra i laboratori	100%	1,00/[0,43-2,14]
Riproducibilità tra i lotti	100%	-

8.1.5. Interferenze esogene e esogene

È stata eseguita una valutazione del rischio per valutare il potenziale impatto delle sostanze interferenti endogene ed esogene sulle prestazioni del saggio. I potenziali interferenti sono stati identificati dalla letteratura e da prodotti simili basati su NGS.

Diverse sostanze (ad esempio, proteinasi K, formalina, emoglobina, coloranti per la marcatura dei tessuti, etanolo) sono note come inibitori delle reazioni enzimatiche utilizzate nella preparazione delle librerie di DNA. A concentrazioni sufficientemente elevate, queste potrebbero ridurre l'efficienza enzimatica e portare al fallimento del test ("nessun risultato"), ma non a chiamate di varianti errate o a una classificazione errata dello stato GI. Altre sostanze valutate (ad esempio, trigliceridi, paraffina, xilene) non hanno interferito con il flusso di lavoro del test.

Non sono stati identificati meccanismi in base ai quali le sostanze interferenti potrebbero causare risultati falsi positivi o falsi negativi sullo stato GI. In conclusione, si prevede che la presenza di sostanze interferenti, se presenti, aumenti la probabilità di fallimento del test, ma non influisce sulla specificità analitica o sulla determinazione dello stato GI.

8.1.6. Carry over e contaminazione crociata

I rischi legati agli eventi di carryover da corsa a corsa e da campione a campione, così come le potenziali reazioni incrociate, sono stati affrontati e mitigati attraverso strategie sperimentali e computazionali.

I rischi di carryover sono stati valutati attraverso indagini sul funzionamento del sequenziatore NextSeq550, l'implementazione delle procedure di controllo qualità esistenti e l'analisi di serie di dati che simulavano i processi di carryover. Parallelamente, i rischi di reazione incrociata sono stati mitigati grazie alla progettazione dell'algoritmo implementato nella soluzione SOPHiA DDM Dx HRD per il calcolo dell'indice GI e dello stato GII, che garantisce la robustezza contro i modelli di copertura genomica che potrebbero altrimenti portare ad assegnazioni errate. La robustezza di questo algoritmo è stata ulteriormente confermata attraverso l'analisi di valori anomali di copertura mirati e selezionati in modo casuale, che non hanno influito sull'accuratezza della determinazione dello stato GII. Nel complesso, le prove generate in questa valutazione del rischio indicano che né il carryover né gli eventi di reazione incrociata rappresentano un rischio significativo per i processi di chiamata delle varianti e di chiamata dello stato GII implementati come parte della soluzione SOPHiA DDM Dx HRD.



8.2. Valutazione delle prestazioni cliniche

Le prestazioni cliniche di SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution sono state accertate in uno studio clinico osservazionale retrospettivo su 110 estratti di DNA derivati da materiale tumorale FFPE. Tutti i campioni provenivano da tumori ovarici. Il contenuto tumorale definito di tutti i campioni variava dal 30% al 90%. La qualità degli estratti di DNA è stata valutata mediante determinazione del DQN sul Fragment Analyzer (Agilent Technologies, Inc.) utilizzando 300bp come soglia. Tutti gli estratti di DNA presentavano un DQN>3, 105 estratti di DNA presentavano un DQN>5, 5 estratti di DNA presentavano un DQN≤5.

Lo stato HRD di riferimento di tutti i campioni è stato stabilito da un test genomico IVD in commercio che combina l'instabilità genomica e l'analisi delle mutazioni BRCA1/BRCA2. Il confronto di questo stato HRD di riferimento con lo stato SOPHiA DDM™ Dx HRD definito nello studio clinico ha permesso di calcolare la sensibilità diagnostica, la specificità diagnostica, i valori predittivi positivi e negativi e i rapporti di probabilità positivi e negativi. Dei 110 campioni, 15 sono stati esclusi dai calcoli a causa di risultati non validi: 8 campioni avevano uno stato SOPHiA DDM™ Dx HRD non determinato, 12 campioni avevano uno stato HRD di riferimento Failed e 5 campioni avevano uno stato non valido per entrambi i metodi.

Parametro	Valore (95% C.I.)
Sensibilità diagnostica	80.9% [67.5%-89.6%]
Specificità diagnostica	93.7% [83.2%-97.9%]
Valore predittivo positivo	92,7%
Valore predittivo negativo	83,3%
Rapporto di probabilità positiva	12,9
Rapporto di probabilità negativa	0,2



9. AVVERTENZE, LIMITAZIONI E PRECAUZIONI

9.1. Avvertenze

- Solo per le procedure di diagnostica in vitro. Le decisioni sulla cura e il trattamento del paziente devono essere basate sul criterio indipendente del medico curante, prendendo in considerazione tutte le informazioni applicabili riguardanti la condizione del paziente, tra cui la storia clinica del paziente e della famiglia, esami fisici, le informazioni fornite da altri test diagnostici e le preferenze del paziente, in conformità con gli standard sanitari della comunità.
- SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution è stata convalidata su DNA estratto da campioni FFPE di carcinoma ovarico con DQN ≥ 3 (misurato con il sistema Agilent Fragment Analyzer™), contenuto tumorale $\geq 30\%$ e sequenziato su Illumina® NextSeq® 500/550.
- La scarsa qualità dei dati NGS grezzi può confondere l'analisi dei dati e causare falsi positivi, falsi negativi e risultati inconsistenti.
- Gli utenti devono verificare che la qualità dei loro campioni di DNA soddisfi i criteri minimi di qualificazione:
 - Contenuto tumorale $\geq 30\%$
 - DQN ≥ 3 , misurato con il sistema Agilent Fragment Analyzer™.
 - 50ng o 100ng di DNA di input a seconda del DQN (vedi protocollo)
- È stato osservato che i dispositivi per l'elettroforesi su gel ad alta risoluzione diversi dal sistema Agilent Fragment Analyzer™ (ad esempio, Agilent TapeStation) portano a una stima distorta del DQN sui campioni di DNA FFPE. Il sistema Agilent Fragment Analyzer™ è l'unico dispositivo adatto a qualificare i campioni per SOPHiA DDM™ Dx HRD Solution
- L'elaborazione di campioni non idonei potrebbe portare a risultati errati. SOPHiA GENETICS non è responsabile dei risultati e delle conseguenti decisioni prese sulla base di tali risultati.
- Un DQN maggiore o uguale a 3 non può escludere la presenza di altri problemi di natura qualitativa nel campione di DNA. Poiché l'accuratezza dell'analisi dipende dalla qualità e dalla quantità del DNA, gli utenti devono assicurarsi che il flusso di lavoro completo utilizzato per ottenere il DNA di input sia compatibile con il test, prima di procedere con le analisi cliniche.
- Lo stato di SOPHiA DDM™ Dx HRD si basa esclusivamente sui risultati dell'analisi dell'integrità genomica e non prende in considerazione lo stato mutazionale di altri geni. Uno stato negativo di SOPHiA DDM™ Dx HRD non esclude la presenza di mutazioni in altri geni.

9.2. Limitazioni

- Il prodotto è progettato per elaborare il volume di dati prodotti da un singolo studio Illumina® NextSeq® 500/550 (celle a flusso Mid-Output e High-Output). La dimensione massima della richiesta non può superare i 200 Gb. La dimensione massima del file per campione non può superare i 50 Gb. La pipeline esegue un sottocampionamento casuale delle letture su tutti i campioni che superano i 5 Gb di file fastq compressi.
- Anche se vengono seguite le raccomandazioni per il multiplexing dei campioni, il numero totale di letture può essere insufficiente per fornire risultati conclusivi per vari motivi, tra cui la scarsa qualità dei campioni, la scarsa



qualità dei dati NGS, l'allocazione significativamente disomogenea delle letture tra WGS e librerie catturate, l'allocazione significativamente disomogenea delle letture tra i campioni multiplexati nello stesso studio.

- Il prodotto non rileva né segnala eventi di contaminazione incrociata dei campioni.
- Un'esecuzione non corretta dell'estrazione del DNA, della preparazione delle librerie e/o del sequenziamento può portare al rifiuto del campione, nonché a risultati falsi positivi o falsi negativi.
- Un'esecuzione non corretta della fase di cattura potrebbe portare al rifiuto del campione a causa di un'eccessiva copertura di letture fuori target.
- Il prodotto non misura né riporta il contenuto di tumore del campione.
- Il limite di rilevamento per la determinazione dello stato SOPHiA DDM™ Dx HRD e dello stato di integrità genomica è un contenuto tumorale del 30%. L'elaborazione di campioni con un contenuto tumorale <30% può dare luogo a risultati GI inconclusive o GI negative*, ma anche a risultati falsi negativi.
- I campioni con stato SOPHiA DDM™ Dx HRD negativo e stato di integrità genomica negativo* sono associati a un valore predittivo negativo inferiore.
- I dati WGS low-pass non consentono di distinguere in modo affidabile i campioni privi di grandi alterazioni del numero di copie da quelli con un contenuto tumorale insufficiente. L'elaborazione di campioni che non presentano grandi alterazioni del numero di copie porterà a risultati GI inconclusive.
- Le metriche QA GI e l'indice GI riferiti agli utenti finali si ottengono arrotondando i valori di precisione completa utilizzati per i calcoli dello stato QA e dello stato GI al primo o al secondo decimale (a seconda della metrica).

9.3. Precauzioni

- Le norme e le procedure di buona pratica di laboratorio, oltre a seguire scrupolosamente le IFU, sono necessarie per ottenere prestazioni adeguate del prodotto. Qualsiasi deviazione dalle istruzioni relative alla manipolazione dei campioni, al protocollo di laboratorio, al multiplexing e al sequenziamento può influire negativamente sulla qualità dei dati NGS grezzi.
- Per evitare la contaminazione del campione di DNA, devono essere usati locali fisicamente separati per il pre e il post PCR.
- Per eseguire l'esperimento, usare pipette calibrate correttamente e attrezzature di laboratorio adeguate.
- Non mischiare reagenti con numeri di lotto diversi
- Conservare e maneggiare i reagenti secondo le istruzioni riportate sulle scatole dei kit e non utilizzarli se scaduti.
- Alcuni reagenti possono richiedere precauzioni di sicurezza. Per informazioni specifiche sulla sicurezza, consultare le schede di sicurezza dei materiali (MSDS) corrispondenti a ciascun componente del prodotto.
- La concentrazione raccomandata di EDTA nel tampone di conservazione del DNA è pari a 0,1 mM. Un eccesso di EDTA nei tamponi di conservazione dei campioni potrebbe compromettere l'elaborazione dei campioni stessi.
- Per le istruzioni dettagliate sul software, consultare il manuale utente della modalità SOPHiA DDM™ Dx.



10. SIMBOLI

Simbolo	Titolo
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Numero di catalogo
	Codice lotto (numero di lotto)
	Attenzione
	Produttore
	Limite di temperatura
	Data di scadenza
	Conformità europea
	Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
	Contiene un numero sufficiente per <n> test
	Importatore
	Consultare il paragrafo Avvertenze e precauzioni nella sezione 5.
	Consultare il paragrafo Avvertenze e precauzioni nella sezione 5.
	Consultare il paragrafo Avvertenze e precauzioni nella sezione 5.
	Consultare il paragrafo Avvertenze e precauzioni nella sezione 5.
	Consultare il paragrafo Avvertenze e precauzioni nella sezione 5.
	Box 1
	Box 2



11. SUPPORTO

In caso di difficoltà nell'utilizzo di SOPHiA DDM™, consultare la sezione "Risoluzione dei problemi" del manuale d'uso della Modalità DDM™ Dx o contattare il nostro servizio di assistenza telefonica al numero +41 21 694 10 60 o via e-mail support@sophiagenetics.com. Visitare il sito www.sophiagenetics.com per maggiori dettagli. È possibile richiedere assistenza anche tramite web dalla schermata Dashboard nella sezione Supporto di SOPHiA DDM™.

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



APPENDICE I. PIASTRE PRIMER PER DOPPIO INDICE UNIVOCO

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

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

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

Indice	Sequenze i5 per foglio campione NextSeq	i7
sgUDI-49	CAGTGAGC	ACCAAGGA
sgUDI-50	CAATCCTG	CAGACCTG
sgUDI-51	AACTAGAC	CGAGCAAC
sgUDI-52	GCCATTCA	TCTTGACT
sgUDI-53	ATTGTCGT	GACAATGG
sgUDI-54	TGGCGTTC	GTTCTACG
sgUDI-55	CAGGACAG	AACGCTGC
sgUDI-56	GTCCTTAT	GGACATCA
sgUDI-57	GGAATGTA	TTGAGCTC
sgUDI-58	AGCTAACC	ACGTTGAG
sgUDI-59	TCAGCAGG	CTTCAGGA
sgUDI-60	GATTGAGG	TGCCAACT
sgUDI-61	ATTCTTCG	AGGTCATG
sgUDI-62	CTCGACTA	TACTAGCA
sgUDI-63	GTGAGGAT	GTAAGTGT
sgUDI-64	ACTGCAGC	TGAGTTGA



Indice	Sequenze i5 per foglio campione NextSeq	i7
sgUDI-65	CGATTGCC	CCTTAGAC
sgUDI-66	TAAGATGC	TATCGCCA
sgUDI-67	TTCAGCAC	GCAGAACA
sgUDI-68	GCGTCAAT	AGGAATGC
sgUDI-69	AATGCGGC	CGTGAGGT
sgUDI-70	TGACTACA	CAATTCAG
sgUDI-71	TCGGAGGA	GGTCCTTC
sgUDI-72	CTCGATTG	TTCCGGCA
sgUDI-73	CGGACTTA	ATGCCTGA
sgUDI-74	AACTGTCC	TCCAGGAC
sgUDI-75	TCACTCAA	GCTGTCAC
sgUDI-76	ATGTTACG	CGACGATT
sgUDI-77	ACTGCGTA	TCGCAACG
sgUDI-78	GGTCAGGT	GAGTTGTA
sgUDI-79	TCAGGTGG	CGCTAAGG
sgUDI-80	CACGGTGA	TTGCGTGC



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



PREPARAZIONE LIBRERIA

Con SOPHiA GENETICS™ Dx DNA Library Prep Kit III



CATTURA

FLUSSO DI LAVORO FACILE

- SOLO 1-2 PROVETTE DA GESTIRE (LIBRERIE IN POOL MULTIPLEX)
- SOLO 3 ORE DI LAVORO



Document Approvals
Approved Date: 28 Jan 2026

Approval Verdict: Approve	Coleman Spence, (cspence@sophiagenetics.com) Regulatory Approval 28-Jan-2026 01:09:26 GMT+0000
QA Approval Verdict: Approve	Claire Mullane, (cmullane@sophiagenetics.com) Quality Assurance Approval 28-Jan-2026 08:54:39 GMT+0000