

ISTRUZIONI PER L'USO

16, 32, 48 e 96 campioni

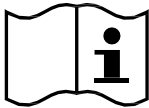
SOPHiA GENETICS™
Dx Universal Library Prep





SINTESI DELLE INFORMAZIONI

Nome prodotto	SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep
Tipo di prodotto	Kit preparazione libreria
Famiglia di prodotti	Kit molecolare
Versione del prodotto	v1.0
Tipo di campione	DNA genomico (gDNA) isolato da sangue, midollo osseo, tessuto fresco congelato (FF), tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE)
ID documento	SG-08746
Versione del documento	v1.0
Data di revisione	Gennaio 2026



Prima di utilizzare questo prodotto, leggere attentamente le Istruzioni per l’uso.



BX6002UNICMDL30-16
BX6002UNICMDL30-32
BX6002UNICMDL30-48
BX6002UNICMDL30-96
BX6002UNICMDL31-16
BX6002UNICMDL31-32
BX6002UNICMDL31-48
BX6002UNICMDL31-96



Per uso diagnostico in vitro



SOPHiA GENETICS SA
ZA La Pièce 12
1180 Rolle
Switzerland



SOPHiA GENETICS S.A.S
Technopole Izarbel
158 allée Fauste d’Elhuyar
64210 Bidart, France



CODICI DEI PRODOTTI

Codici prodotto per SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep – configurazione Stubby Adapters

CODICE PRODOTTO COMPLETO	VERSIONE DEL PRODOTTO
BX6002UNICMDL30-16	SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep Stubby - Y30 - 16rx
BX6002UNICMDL30-32	SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep Stubby - Y30 - 32rx
BX6002UNICMDL30-48	SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep Stubby - Y30 - 48rx
BX6002UNICMDL30-96	SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep Stubby - Y30 - 96rx

Codici prodotto per SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep – configurazione CUMIN™ Adapters

CODICE PRODOTTO COMPLETO	VERSIONE DEL PRODOTTO
BX6002UNICMDL31-16	SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep CUMIN - Y31 - 16rx
BX6002UNICMDL31-32	SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep CUMIN - Y31 - 32rx
BX6002UNICMDL31-48	SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep CUMIN - Y31 - 48rx
BX6002UNICMDL31-96	SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep CUMIN - Y31 - 96rx

ID COMPONENTE	NOME DEL COMPONENTE
LIBRARY PREPARATION KIT BOX	SOPHiA GENETICS™ Dx Modular Universal Library Prep
BOX 1	SOPHiA GENETICS™ Dx Modular Library Prep - Box1
BOX 2	SOPHiA GENETICS™ Dx Modular Library Prep - Box2
CUMIN BOX*	SOPHiA GENETICS™ Dx Modular CUMIN Adapters

*Componente fornito solo con le configurazioni di CUMIN™ Adapters

Codici dei componenti per SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep – configurazione Stubby Adapters

CODICE PRODOTTO COMPLETO	LIBRARY PREPARATION KIT BOX	BOX 1	BOX 2
BX6002UNICMDL30-16	4C0232	B1.G1.6002.C-16	B2.6002.C-16
BX6002UNICMDL30-32	2 x 4C0232	B1.G1.6002.C-32	B2.6002.C-32
BX6002UNICMDL30-48	4C0234	B1.G1.6002.C-48	B2.6002.C-48
BX6002UNICMDL30-96	2 x 4C0234	B1.G1.6002.C-96	2 x B2.6002.C-48

Codici dei componenti per SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep – configurazione CUMIN™ Adapters

CODICE PRODOTTO COMPLETO	LIBRARY PREPARATION KIT BOX	BOX 1	BOX 2	CUMIN BOX
BX6002UNICMDL31-16	4C0232	B1.F1.6002.C-96	B2.6002.C-16	905C1648
BX6002UNICMDL31-32	2 x 4C0232	B1.F1.6002.C-96	B2.6002.C-32	905C1648
BX6002UNICMDL31-48	4C0234	B1.F1.6002.C-96	B2.6002.C-48	905C1648
BX6002UNICMDL31-96	2 x 4C0234	B1.F1.6002.C-96	2 x B2.6002.C-48	2 x 905C1648



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®, HiSeq®, NextSeq® e MiSeq® sono marchi registrati di Illumina, Inc. NovaSeq™ è un marchio di Illumina, Inc. Agencourt® AMPure® XP sono marchi registrati di Beckman Coulter, Inc. Qubit® e Dynabiglie® sono marchi registrati di Thermo Fisher Scientific Inc.

SOPHiA GENETICS™ 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-08746 v1.0	Gennaio 2026	SG-08540 v3.0	• Versione iniziale



S o m m a r i o

Sommario	5
1. Finalità previste	6
2. Dichiarazione generale dei principi e della procedura del test	7
3. Materiali e metodi	8
3.1 Materiali	8
3.1.1 Considerazioni iniziali	8
3.1.2 Contenuto del kit (16, 32, 48 e 96 reazioni)	8
3.1.3 Sostanze pericolose	11
3.1.4 Materiale richiesto (non fornito)	12
3.2 Raccomandazioni sui campioni	13
3.2.1 Raccolta e conservazione dei campioni	13
3.2.2 Raccomandazioni sull'input di DNA	13
3.3 Preparazione libreria	14
3.3.1 Preparazione del materiale di input	14
3.3.2 Preparazione dei pre-mix e dei reagenti	15
3.3.3 Frammentazione enzimatica, riparazione finale e A-tailing	17
3.3.4 Legatura	18
3.3.5 Pulizia post-legatura	20
3.3.6 Amplificazione della libreria	21
3.3.7 Pulizia post-amplificazione	22
3.3.8 Quantificazione individuale della libreria e controllo qualità	23
3.4 Sequenziamento	25
3.4.1 Preparazione al sequenziamento	25
4. Avvertenze, limitazioni e precauzioni	26
4.1 Avvertenze	26
4.2 Limitazioni	26
4.3 Precauzioni	27
5. Risoluzione dei problemi	28
6. Caratteristiche di prestazione	29
6.1.1 Tipo di campione	29
6.1.2 Riproducibilità inter-laboratorio	29
6.1.3 Quantità di DNA in input	29
6.1.4 Riproducibilità tra diversi lotti di reagenti	29
6.1.5 Contaminazione crociata tra campioni	29
6.1.6 Sostanze interferenti	30
7. Simboli	31
8. Supporto	33
9. Appendici	34
9.1 Appendice I: Piastre primer per doppio indice univoco	34
9.1.1 96A Unique Dual Index Primer Plate, formato piastra a 96 pozzetti (7 µl ciascuno) – Piastra A (IPdCUDIpA96)	34
9.1.2 Sequenze di indice per i primer Unique Dual Index	34
9.1.3 Diluizioni di caricamento per sequenziatori	39
9.2 Appendice II: Workflow generale di SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep	40



1. Finalità previste

SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep è un kit di reagenti utilizzato per la preparazione di librerie di sequenziamento di nuova generazione (NGS) a partire da DNA genomico isolato da cellule e tessuti umani. Le librerie generate possono essere utilizzate sulle piattaforme di sequenziamento successive.

SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep è un set di reagenti non automatizzato destinato all'uso nell'ambito di esami diagnostici in vitro sviluppati dall'utente, da parte di professionisti sanitari qualificati.



2. Dichiarazione generale dei principi e della procedura del test

SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep contiene tutti gli enzimi, i tamponi associati, nonché le piastre di indicizzazione e gli adattatori di legatura necessari per eseguire il flusso di lavoro, dal DNA estratto alla generazione di una libreria di genoma intero non arricchita, idonea alle successive fasi di arricchimento e sequenziamento (**Figura 1**).

Il prodotto SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep consente di eseguire le seguenti fasi:

1. Frammentazione, riparazione delle estremità e A-tailing: frammentazione enzimatica del DNA e preparazione delle estremità del DNA per la legatura degli adattatori (Frag/ERAT in **Figura 1**).
2. Legatura degli Stubby Adapter o dei CUMIN Adapters di SOPHiA GENETICS™ (abbreviati in CUMIN™ Adapters): legatura degli Stubby Adapters o CUMIN™ Adapters ai frammenti di DNA per prepararli all'indicizzazione e all'amplificazione (Legatura in **Figura 1**).
3. Indicizzazione e amplificazione: amplificazione dei frammenti di DNA legati agli adattatori mediante primer PCR con codice a barre per preparare il DNA al sequenziamento (PCR in **Figura 1**).

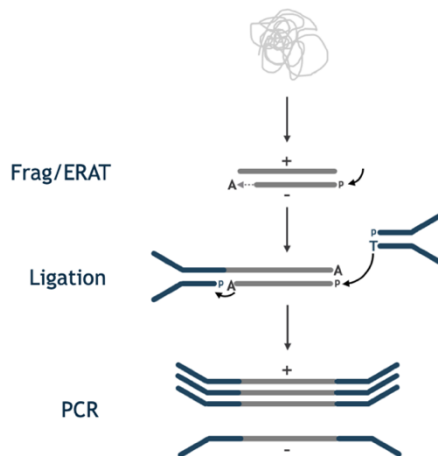


Figura 1: Descrizione del flusso di lavoro per SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep.



3. Materiali e metodi

3.1 Materiali

3.1.1 Considerazioni iniziali

Al momento della ricezione, assicurarsi che tutte le provette siano fisicamente integre e conservate alle temperature consigliate per garantire prestazioni ottimali del kit. Una manipolazione o una conservazione non corrette dei componenti del kit possono comprometterne le prestazioni. Contattare il produttore (vedere la sezione 8 SUPPORTO per i dettagli) se i componenti del kit risultano danneggiati o se il ghiaccio secco è esaurito.



La confezione di spedizione contiene ghiaccio secco per il raffreddamento. Il ghiaccio secco rilascia anidride carbonica. Garantire una ventilazione adeguata durante il disimballaggio. Evitare il contatto diretto con il ghiaccio secco. Durante la manipolazione, utilizzare dispositivi di protezione, tra cui camice da laboratorio, guanti isolanti e protezione per gli occhi.



3.1.2 Contenuto del kit (16, 32, 48 e 96 reazioni)



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

A seconda del formato del kit (numero di reazioni coperte dal kit) e della versione (configurazione del kit con STUBBY Adapters o CUMIN), vengono forniti i seguenti componenti:

COMPONENTE	NUMERO DI ARTICOLI A SECONDA DEL FORMATO DEL KIT			
	16 reazioni	32 reazioni	48 reazioni	96 reazioni
SOPHiA GENETICS™ Dx Modular Universal Library Prep	1 x 16 box reazioni	2 x 16 box reazioni	1 x 48 box reazioni	2 x 48 box reazioni
<i>Stubby Adapters configuration:</i> SOPHiA GENETICS™ Dx Modular Library Prep – Box 1	1 x 16 box reazioni	1 x 32 box reazioni	1 x 48 box reazioni	1 x 96 box reazioni
<i>CUMIN™ Adapters configuration:</i> SOPHiA GENETICS™ Dx Modular Library Prep – Box 1	1 x 96 box reazioni	1 x 96 box reazioni	1 x 96 box reazioni	1 x 96 box reazioni
SOPHiA GENETICS™ Dx Modular Library Prep – Box 2	1 x 16 box reazioni	1 x 32 box reazioni	1 x 48 box reazioni	2 x 48 box reazioni
<i>CUMIN™ Adapters configuration only:</i> SOPHiA GENETICS™ Dx Modular CUMIN Adapters	1 x 48 box reazioni	1 x 48 box reazioni	1 x 48 box reazioni	2 x 48 box reazioni

* SOPHiA GENETICS™ Dx Modular Library Prep – Box 1 in configurazione Stubby Adapters contiene una piastra 96A Unique Dual Index Primer Plate per 96 reazioni



SOPHiA GENETICS™ Dx Modular Universal Library Prep (Conservare a -25 °C – -15 °C)*

REAGENTE (COLORE DEL TAPPO)	FORMATO DEL KIT				INGREDIENTI ATTIVI
	16 reazioni	32 reazioni*	48 reazioni	96 reazioni*	
PCR Master Mix 2x (tappo bianco)	520 µl	2 x 520 µl	1560 µl	2 x 1560 µl	Il Master Mix contiene DNA polimerasi, tampone di reazione, dNTP e MgCl ₂
Fragmentation Buffer (tappo marrone)	77 µl	2 x 77 µl	231 µl	2 x 231 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente cloruro di tetrametilammonio
Fragmentation Enzyme Mix (tappo marrone)	116 µl	2 x 116 µl	346 µl	2 x 346 µl	Miscela di enzimi frammentasi e agenti tampone
Ligation Enzyme (tappo viola)	192 µl	2 x 192 µl	576 µl	2 x 576 µl	Miscela di enzimi di legatura e agenti tampone
Ligation Buffer 5x (tappo viola)	384 µl	2 x 384 µl	1153 µl	2 x 1153 µl	Tampone premiscelato per la reazione di legatura del DNA

* Per il formato kit da 32 reazioni (32rx) vengono forniti due box da 16 reazioni.

* Per il formato kit da 96 reazioni (96rx) vengono forniti due box da 48 reazioni.



Fare riferimento alla sezione 3.1.3 Sostanze pericolose per informazioni sulle sostanze pericolose incluse nei reagenti.

SOPHiA GENETICS™ Dx Modular Library Prep – Box 1 (Conservare a +2 °C – +8 °C)

SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep – configurazione Stubby Adapters:

REAGENTE (COLORE DEL TAPPO)	FORMATO DEL KIT				INGREDIENTI ATTIVI
	16 reazioni	32 reazioni	48 reazioni	96 reazioni	
SU-Adapter (tappo blu)	110 µl	220 µl	320 µl	650 µl	Adattatori universali Stubby – pool di oligonucleotidi
96A Unique Dual Index Primer Plate [Plate A]	Formato piastra 1x96 pozzetti (7 µl di primer per pozzetto)				Pool di oligonucleotidi, fare riferimento all'Appendice I per informazioni sulla disposizione delle piastre e sulle sequenze dei primer

SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep – configurazione CUMIN Adapters:

REAGENTE*	FORMATO DEL KIT				INGREDIENTI ATTIVI
	16 reazioni	32 reazioni	48 reazioni	96 reazioni	
96A Unique Dual Index Primer Plate [Plate A]	Formato piastra 1x96 pozzetti (7 µl di primer per pozzetto)				Pool di oligonucleotidi, fare riferimento all'Appendice I per informazioni sulla disposizione delle piastre e sulle sequenze dei primer

*In caso di configurazione con CUMIN™ Adapters, gli adattatori sono forniti in una scatola separata



SOPHiA GENETICS™ Dx Modular Library Prep – Box 2 (Conservare a +2 °C – +8 °C)

REAGENTE (COLORE DEL TAPPO)	FORMATO DEL KIT				INGREDIENTI ATTIVI
	16 reazioni	32 reazioni	48 reazioni	96 reazioni*	
Agencourt® AMPure® XP (tappo trasparente)	3 x 1,5 ml	7.2 ml	9.2 ml	2 x 9,2 ml	Perle paramagnetiche sospese in soluzione tamponata
IDTE Buffer pH 8.0 (tappo trasparente)	10 ml	10 ml	10 ml	2 x 10 ml	Soluzione 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA
Nuclease Free Water (tappo trasparente)	20 ml	20 ml	20 ml	2 x 20 ml	Acqua senza nucleasi

* Per il formato kit da 96 reazioni (96rx) vengono forniti due kit da 48 reazioni.

SOPHiA GENETICS™ Dx Modular CUMIN Adapters (Conservare a -25 °C – -15 °C)

SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep – configurazione CUMIN Adapters:

REAGENTE (COLORE DEL TAPPO)	FORMATO DEL KIT				INGREDIENTI ATTIVI
	16 reazioni	32 reazioni	48 reazioni	96 reazioni	
CUMIN family "A" (tappo arancione)	36 µl	36 µl	36 µl	2x36 µl	Pool di oligonucleotidi
CUMIN family "B" (tappo rosa)	36 µl	36 µl	36 µl	2x36 µl	Pool di oligonucleotidi
CUMIN family "C" (tappo rosso)	36 µl	36 µl	36 µl	2x36 µl	Pool di oligonucleotidi
CUMIN family "D" (tappo giallo)	36 µl	36 µl	36 µl	2x36 µl	Pool di oligonucleotidi
CUMIN family "E" (tappo marrone)	36 µl	36 µl	36 µl	2x36 µl	Pool di oligonucleotidi
CUMIN family "F" (tappo verde)	36 µl	36 µl	36 µl	2x36 µl	Pool di oligonucleotidi
CUMIN family "G" (tappo blu)	36 µl	36 µl	36 µl	2x36 µl	Pool di oligonucleotidi
CUMIN family "H" (tappo viola)	36 µl	36 µl	36 µl	2x36 µl	Pool di oligonucleotidi



3.1.3 Sostanze pericolose

Scheda di sicurezza disponibile su richiesta e online sul seguente sito web: www.sophiagenetics.com/docs/

NOME DEL REAGENTE	GHS PITTOGRAMMA	FRASI H E P	SEGNALE PAROLA	SOSTANZA PERICOLOSA
Fragmentation Buffer e PCR Master Mix 2x	 	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 ANTIVELENI o un medico. P301 + P312, P330 SE INGERITO: Chiamare un CENTRO ANTIVELENI 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.	Avvertenza	Cloruro di tetrametilammonio [CAS 75-57-0] 1-3%



Per ridurre il rischio di esposizione, indossare dispositivi di protezione, tra cui occhiali di sicurezza, guanti e camice da laboratorio





3.1.4 Materiale richiesto (non fornito)

Materiali forniti dall'utente (da acquistare separatamente)

Materiale plastico da laboratorio

- Provette a basso legame con il DNA da 1,5 ml
- Provette coniche da 50 ml
- Punte filtro
- Provette da 1,5 ml
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

Reagenti

- Etanolo (grado biologia molecolare)

Altro

- Ghiaccio per garantire che reagenti e premiscele siano mantenuti a 4 °C
- Reagenti di sequenziamento Illumina® e flow cell

Attrezzatura da laboratorio

Per evitare la contaminazione dei campioni, suddividere l'area di lavoro in:

- *Zona pre-PCR*
 - Strumentazione e reagenti per la quantificazione fluorimetrica (ad es. Qubit® o equivalente)
 - Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti
 - Pipette multicanale (P10 o P20; P100; P200) con puntali con filtro idonei
 - Microcentrifuga da banco (compatibile con strisce da 8 provette)
 - Termociclatore (coperchio riscaldato programmabile; provette PCR da 0,2 ml compatibili)
 - Miscelatore a vortice
- *Zona post-PCR*
 - Sistema di elettroforesi capillare
 - Strumentazione e reagenti per la quantificazione fluorimetrica (ad es. Qubit® o equivalente)
 - Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti
 - Pipette multicanale (P10 o P20; P100; P200) con puntali con filtro idonei
 - Microcentrifuga da banco (compatibile con strisce da 8 provette)
 - Termociclatore (coperchio riscaldato programmabile; provette PCR da 0,2 ml compatibili)
 - Miscelatore a vortice



3.2 Raccomandazioni sui campioni

3.2.1 Raccolta e conservazione dei campioni

Seguire i requisiti di raccolta, trasporto e conservazione dei campioni applicabili al tipo di campione e al metodo di estrazione del DNA scelto. È possibile utilizzare qualsiasi metodo di estrazione validato che consenta di ottenere campioni di DNA conformi ai requisiti indicati nelle raccomandazioni sull'input. Il DNA purificato deve essere trasportato e conservato in condizioni adeguate secondo le raccomandazioni fornite dal produttore del kit di estrazione del DNA. Evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelo.

3.2.2 Raccomandazioni sull'input di DNA

Il DNA utilizzato come input per SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep deve essere qualificato prima dell'uso. Integrità, concentrazione e purezza del DNA sono fattori critici che influiscono sulle prestazioni del test. Utilizzare qualsiasi metodo di estrazione degli acidi nucleici validato che garantisca un recupero efficiente del DNA e mantenga la qualità del campione.

RACCOMANDAZIONI SULLA QUALITÀ DELL'INPUT

DNA ESTRATTO DA TESSUTO FRESCO CONGELATO, SANGUE O MIDOLLO OSSEO: La purezza del DNA può essere valutata con uno spettrofotometro UV. I rapporti di assorbanza raccomandati sono compresi tra 1,8–2,0 per il rapporto 260/280 nm e tra 1,6–2,4 per il 260/230. Rapporti di assorbanza al di fuori degli intervalli sopra indicati possono compromettere la preparazione della libreria o le prestazioni del saggio.

DNA ESTRATTO DA TESSUTO FFPE: La qualità del DNA estratto da FFPE è variabile e può influire negativamente sulle prestazioni del test. L'esposizione alla formalina danneggia l'integrità della molecola generando frammentazione del DNA. Inoltre, induce artefatti di sequenziamento dovuti a eventi di deaminazione. Si raccomanda di verificare l'integrità del campione mediante elettroforesi capillare o una tecnica equivalente.

Valutazione della qualità del DNA: Analizzare 5–10 ng di DNA genomico sul Agilent Fragment Analyzer™ System utilizzando il kit HS large fragment 50 kb (DNF-464-0500) o equivalente. La qualità del DNA genomico viene valutata mediante il DNA Quality Number (DQN). Impostare la soglia per il DQN a 375 bp ed estrarre il DQN per i campioni di DNA. Se il DQN non viene misurato o risulta inferiore a 3, la preparazione della libreria può essere compromessa. Un DQN maggiore o uguale a 3 non esclude la presenza di altri problemi di qualità nel campione di DNA.

RACCOMANDAZIONI SULLA QUANTITÀ DI INPUT

Si raccomanda l'uso di 50 ng di DNA come materiale di input, tuttavia il protocollo può essere utilizzato in un intervallo compreso tra 10 ng e 100 ng di materiale di input regolando il numero di cicli PCR secondo la tabella seguente:

CORRELAZIONE TRA INPUT DI DNA E CICLI PCR RICHIESTI (SEZIONE 3.3.6 AMPLIFICAZIONE DELLA LIBRERIA)			
Quantità di DNA (ng)	$10 \leq n < 50$	50	$50 < n \leq 100$
Cicli di PCR	10	8	8

Per evitare quantità errate di DNA in input, si raccomanda una diluizione iniziale per ottenere una concentrazione compresa tra 10–20 ng/μl. La concentrazione di DNA deve essere confermata mediante un metodo di quantificazione fluorimetrica (ad es. Qubit®, Thermo Fisher) e il valore ottenuto deve essere utilizzato per calcolare la diluizione finale.



3.3 Preparazione libreria

3.3.1 Preparazione del materiale di input

Materiali

- DNA genomico (gDNA) estratto da sangue, midollo osseo, tessuto fresco congelato (FF), tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE)
- IDTE Buffer pH 8.0
- Nuclease Free Water
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

Procedura

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

NUMERO DI REAZIONI	4	8	12	16	24	32	48
Tipo di strip 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 estratto nel numero appropriato di strisce PCR come segue:

DILUIZIONE DNA	
DNA	Quantità di DNA (vedere la tabella delle raccomandazioni sull'input di DNA sopra riportata)
IDTE Buffer pH 8.0	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.



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



3.3.2 Preparazione dei pre-mix e dei reagenti

Componenti e reagenti

- Fragmentation Enzyme Mix
- Fragmentation Buffer
- Ligation Enzyme
- Ligation Buffer 5x
- SU-Adapter – configurazione Stubby Adapters
- Adattatori SOPHiA GENETICS™ CUMIN (denominati CUMIN™ Adapters) – configurazione CUMIN Adapters
- 96A Unique Dual Index Primer Plate in formato piastra a 96 pozzetti
- PCR Master Mix 2x
- Nuclease Free Water
- Biglie Agencourt® AMPure® XP
- Etanolo

Preparazione

1. Rimuovere i componenti SOPHiA GENETICS™ Dx dalla conservazione a -20 °C e scongelare su ghiaccio.
2. Rimuovere la 96A Unique Dual Index Primer Plate dalla conservazione a -20 °C e collocarla in frigorifero a 4 °C per usarla successivamente.
3. Rimuovere le biglie Agencourt® AMPure® XP dal luogo di conservazione a 2-8 °C e lasciarle acclimatare alla temperatura ambiente per almeno 30 minuti. Vorticare accuratamente le biglie Agencourt® AMPure® XP, per garantire una corretta risospensione delle stesse, prima di utilizzarle in tutte le fasi successive.
4. Preparare l'etanolo fresco all'80% (volume secondo il seguente schema in base al numero di reazioni):

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

5. Assicurarsi che il Fragmentation Buffer del componente SOPHiA GENETICS™ Dx Modular Universal Library Prep sia completamente scongelato.
6. Una volta scongelati i componenti SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep, miscelare i reagenti capovolgendo la provetta 5–10 volte per garantire l'assenza di precipitati residui e centrifugare brevemente in una microcentrifuga. Posizionare su ghiaccio.



Pre-mix

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

PRE-MIX DI FRAMMENTAZIONE							
Numero di reazioni	4	8	12	16	24	32	48
Fragmentation Buffer (µl)	19,2	38,4	57,6	76,8	115,2	153,6	230,4
Fragmentation Enzyme Mix (µl)	28,8	57,6	86,4	115,2	172,8	230,4	345,6

- 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
Ligation Buffer 5x (µl)	96	192	288	384	576	768	1152
Ligation Enzyme (µl)	48	96	144	192	288	384	576
Nuclease Free Water (µl)	72	144	216	288	432	576	864

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



Il Ligation Buffer 5x è altamente viscoso; pipettare delicatamente e assicurarsi di ottenere un pre-mix di legatura omogeneo.



3.3.3 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

1. 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	∞

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

Procedura



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

1. A seconda del numero di campioni, procedere come segue:
 - Se si stanno processando **4 campioni**, procedere al passaggio 2.
 - Se si stanno processando **8 o più campioni**, per facilitare il pipettaggio, creare una riserva di pre-mix Frammentazione 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
Tipo di strip PCR	4 provette	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Pre-mix di frammentazione (µl)	23	35	23	35	46	70

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.
4. Procedere immediatamente alla legatura.



3.3.4 Legatura

Materiali

- Prodotti di reazione della frammentazione in 50 µl ciascuno
- Pre-mix di legatura
- SOPHiA GENETICS™ CUMIN Adapters O SU-Adapter (Stubby Adapters)
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

Raccomandazioni sugli adattatori SOPHiA GENETICS™ CUMIN Dx

I CUMIN™ Adapters consentono la codifica molecolare delle molecole di DNA in input. Essi (o in alternativa gli Stubby Adapters) devono essere utilizzati durante la fase di legatura della SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep. Il box dei SOPHiA GENETICS™ Dx Modular CUMIN Adapters contiene 8 famiglie di adattatori in provette individuali. Tali famiglie devono essere utilizzate in modo specifico per ciascuna libreria; ossia, a ogni campione deve essere legata una sola famiglia di CUMIN™ Adapters. Lo schema in Figura 1 illustra l'utilizzo raccomandato dei CUMIN™ Adapters.



Figura 2: Schema che illustra la strategia di utilizzo dei CUMIN™ Adapters in funzione del numero di reazioni richieste per il kit da 48 reazioni. I riquadri rosa rappresentano le famiglie CUMIN raccomandate in base al numero di campioni processati.

Quando si utilizzano CUMIN™ Adapters in un prodotto in soluzione bundle, le statistiche specifiche del campione includeranno la percentuale di letture che supportano ciascuna famiglia CUMIN™.



È essenziale che, all'interno di una singola corsa di sequenziamento, tutte le 8 famiglie CUMIN™ siano presenti almeno una volta nel pool di librerie. Deviazioni da quanto indicato comportano la mancata riuscita della corsa di sequenziamento. L'elaborazione di un numero ridotto di campioni con CUMIN™ Adapters richiede l'aggiunta del 20% di libreria PhiX alla corsa di sequenziamento, al fine di garantire la diversità nucleotidica necessaria per una corretta formazione dei cluster. Di conseguenza, nella preparazione di 12, 24 o 48 librerie è necessario pianificare un utilizzo equilibrato di CUMIN™ Adapters tra gli esperimenti, così da evitare l'esaurimento delle singole scorte. La resa in termini di densità di cluster e la qualità delle basi sono state verificate utilizzando un sequenziatore NextSeq® 2000. Altri sequenziatori sono stati testati con esito positivo durante lo sviluppo del prodotto (vedere sezione Limiti 4.2).

Preparazione

1. Durante la reazione Frag/ERAT, preparare nuove strip PCR aggiungendo 5 µl di Stubby Adapters OPPURE CUMIN™ Adapters per ciascuna provetta, secondo lo schema seguente:

NUMERO DI REAZIONI	4	8	12	16	24	32	48
Tipo di strip 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. Impostare il termociclatore a 20 °C (coperchio aperto).

Procedura



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

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

NUMERO DI REAZIONI	8	12	16	24	32	48
Tipo di strip PCR	4 provette	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette	2 × strip da 8 provette
Pre-mix di legatura (μl)	100	150	100	150	200	150

2. Utilizzando una pipetta multicanale, trasferire 50 μl di ciascun prodotto di reazione di frammentazione nelle strip da 4 o 8 tubi contenenti 5 μl di Stubby Adapters OPPURE CUMIN™ Adapters, come illustrato in Figura 2.
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 strip 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 con il clean-up post-legatura.



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



3.3.5 Pulizia post-legatura

Materiali

- Prodotti di reazione legati in 100 µl ciascuno
- Biglie Agencourt® AMPure® XP equilibrate a temperatura ambiente
- Etanolo appena preparato all'80%
- IDTE Buffer pH 8.0
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

Procedura

1. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 80 µl di biglie Agencourt® 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 biglie. 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 biglie a temperatura ambiente per 5 minuti. Non asciugare troppo le biglie perché questo potrebbe diminuire la quantità di DNA recuperato.

Rimuovere le provette dal rack magnetico.

10. Utilizzando una pipetta multicanale, aggiungere 20 µl di IDTE Buffer pH 8.0 alle biglie. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
11. Procedere all'amplificazione della libreria.



3.3.6 Amplificazione della libreria

Materiali

- Prodotti di reazione di legatura e biglie risospesi ciascuno in 20 µl di IDTE Buffer pH 8.0
- PCR Master Mix 2x
- 96A Unique Dual Index Primer Plate

Preparazione

1. 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	n* cicli
Passaggio 3: Annealing	60	30	
Passaggio 4: Estensione	72	30	
Passaggio 5: Estensione finale	72	60	
Mantenere	10	∞	

* Seguire la tabella riportata nella sezione [3.2.2 Raccomandazioni per l'input di DNA](#) per determinare il numero di cicli di PCR in base alla quantità di materiale iniziale.

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 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	12	16	24	32	48
Tipo di strip PCR	4 provette	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette	8 provette
PCR Master Mix 2x (µl)	60	85	60	85	120	170

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 biglie, 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 biglie (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.



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



3.3.7 Pulizia post-amplificazione

Materiali

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

Procedura

1. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 50 µl di biglie Agencourt® 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 biglie. 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 biglie a temperatura ambiente per 5 minuti. Non asciugare troppo le biglie perché questo potrebbe diminuire la quantità di DNA recuperato.
Rimuovere le provette dal rack magnetico.
10. Utilizzando una pipetta multicanale, aggiungere 30 µl di Nuclease Free Water alle biglie. 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 cautela 28 µl del surnatante in una nuova provetta per la conservazione della libreria, opportunamente etichettata.



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



3.3.8 Quantificazione individuale della libreria e controllo qualità

Materiali

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

Procedura

1. Preparare una diluizione 1:4 di ciascuna libreria utilizzando Nuclease Free Water (ad es. 2 µl di libreria in 6 µl di Nuclease Free Water).
2. Quantificare le librerie mediante un metodo fluorimetrico (ad es. quantificazione Qubit HS utilizzando 2 µl della diluizione 4× della libreria preparata in precedenza).
3. Eseguire il controllo qualità delle librerie analizzando il profilo mediante elettroforesi capillare. I frammenti di DNA della libreria devono presentare una distribuzione dimensionale compresa tra 200 bp e 800 bp.

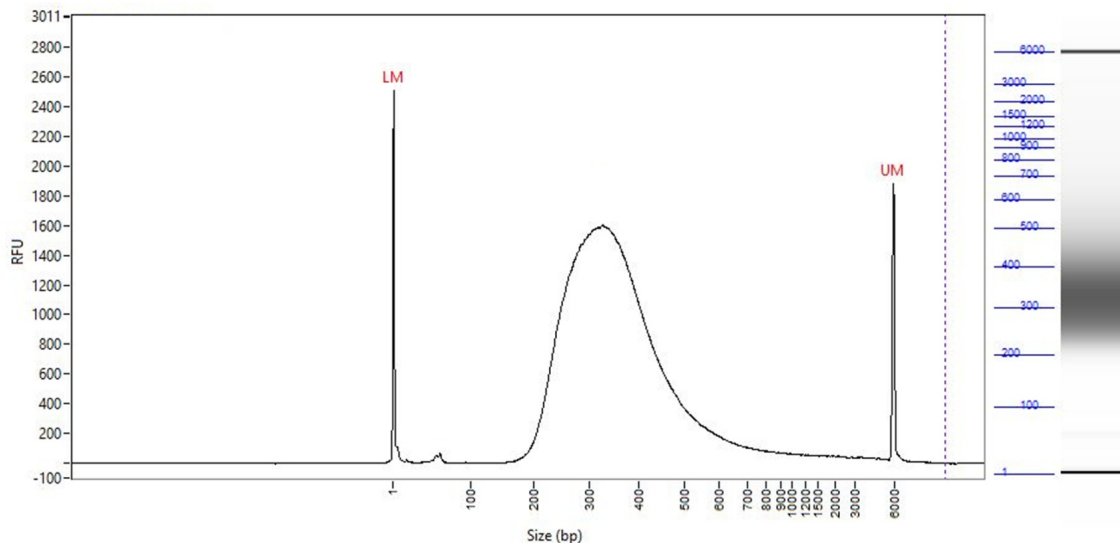


Figure 3. Esempio di distribuzione di una libreria di DNA ottenuta con il sistema di elettroforesi capillare Agilent Fragment Analyzer™ per **campioni di sangue fresco congelato**. LM: Marcatore inferiore, UM: Marcatore superiore.

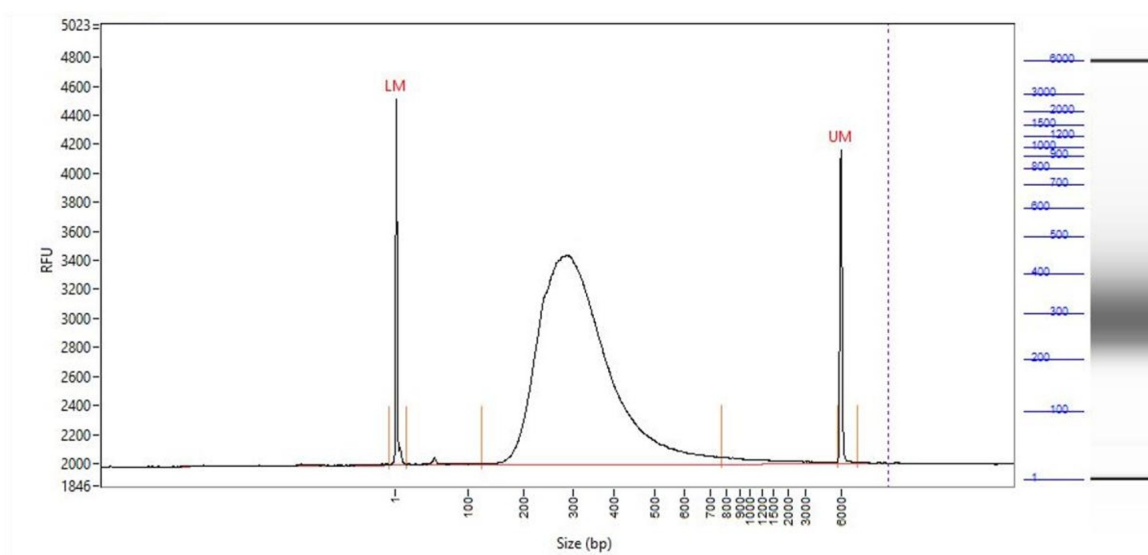


Figura 4. Esempio di distribuzione di una libreria di DNA ottenuta con il sistema di elettroforesi capillare Agilent Fragment Analyzer™ per **campioni FFPE**. LM: Marcatore inferiore, UM: Marcatore superiore.



3.4 Sequenziamento

3.4.1 Preparazione al sequenziamento

Materiali

- Reagenti di sequenziamento Illumina® e flow cell
- Librerie finali
- IDTE Buffer pH 8.0 o equivalente

Procedura

1. Determinare la molarità di ciascun pool di librerie utilizzando la dimensione media della libreria (dimensione del picco in coppie di basi) e la concentrazione (ng/μl) ottenute durante la fase [3.3.8](#) Quantificazione individuale e controllo qualità delle librerie, come segue:

$$\text{Molarità della libreria (nM)} = \frac{\text{Concentrazione della libreria } (\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}})}{\text{Dimensione media in paia di basi} \times 649.5} \times 10^6$$

2. Diluire ciascun pool a 4 nM.
3. Se vengono processati più pool di sequenziamento, miscelarli in quantità uguali (ad es. 5 μl di ciascuno) e utilizzare tale miscela seguendo le raccomandazioni standard Illumina® per la denaturazione.
4. Caricare una diluizione X pM* delle librerie denaturate**.

* Per i dettagli sulle diluizioni, fare riferimento alla sezione [9.1.3](#) Diluizioni di caricamento per sequenziatori.

** La concentrazione di caricamento e la diluizione delle librerie dipendono dallo strumento di sequenziamento utilizzato. Per maggiori dettagli, consultare l'Appendice IV.



4. Avvertenze, limitazioni e precauzioni

4.1 Avvertenze

1. Tutte le procedure diagnostiche sviluppate per l'uso con SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep devono essere sottoposte a una validazione completa che copra tutti gli aspetti prestazionali. La validazione deve includere il kit di estrazione del DNA selezionato, eventuali reagenti aggiuntivi, le apparecchiature, la piattaforma di sequenziamento scelta e il software di analisi.
2. 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.
3. Occorre verificare che la qualità dei campioni di DNA soddisfi i criteri minimi di idoneità, come indicato nella sezione [3.2.2 Raccomandazioni per l'input di DNA](#):
 - Per campioni FFPE, DQN maggiore o uguale a 3 misurato con il sistema Agilent Fragment Analyzer™
 - Per campioni FF, rapporti di assorbanza compresi tra 1,8–2,0 per il rapporto 260/280 nm e tra 1,6–2,4 per il rapporto 260/230
4. Un valore di DQN maggiore o uguale a 3 e rapporti di assorbanza compresi negli intervalli indicati al punto 3 non consentono di escludere la presenza di altri problemi qualitativi nei campioni di DNA.
5. La lavorazione di campioni non qualificati può comportare una qualità insufficiente delle librerie di sequenziamento generate e risultati errati della procedura diagnostica.
6. Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione a SOPHiA GENETICS Dx Universal Library Prep deve essere segnalato al produttore e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiedono l'utilizzatore e/o il paziente.

4.2 Limitazioni

1. Anche se vengono seguite le raccomandazioni per il multiplexing dei campioni, la copertura di lettura ottenuta nelle regioni di interesse potrebbe essere insufficiente per l'uso diagnostico selezionato per diverse ragioni, tra cui: scarsa qualità del campione, bassa qualità dei dati NGS, reagenti downstream di qualità insufficiente o incompatibili, marcata disomogeneità nell'allocatione delle letture tra i campioni multiplexati nella stessa corsa e distribuzione sbilanciata della profondità di lettura nelle regioni genomiche analizzate (ad es. profondità di lettura costantemente inferiore nelle regioni ricche in AT).
2. La preparazione delle librerie è stata validata per DNA estratto da sangue, midollo osseo, pellet cellulari freschi congelati e FFPE, nonché da campioni di tessuto FFPE, e sequenziata su Illumina® MiSeq®, NextSeq® 550, NextSeq® 2000 e NovaSeq 6000™.
3. Il sequenziamento delle librerie NGS generate utilizzando SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep deve essere eseguito con una configurazione paired-end 2×150 bp per garantire una qualità dei dati e prestazioni del saggio ottimali.
4. La stabilità dei reagenti congelati è stata verificata fino a tre cicli di congelamento-scongelo.



4.3 Precauzioni

1. 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.
2. Per evitare la contaminazione del campione di DNA, devono essere usati locali fisicamente separati per il pre e il post PCR.
3. Per eseguire l'esperimento, usare pipette calibrate correttamente e attrezzature di laboratorio adeguate.
4. Utilizzare puntali con filtro per ridurre il rischio di contaminazione di campioni e reagenti.
5. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti durante il prelievo delle aliquote dai flaconi.
6. Non mescolare reagenti con numeri di lotto differenti.
7. Conservare e manipolare i reagenti secondo le istruzioni riportate sulle confezioni del kit e nelle presenti istruzioni per l'uso. I reagenti sono stabili se conservati secondo le indicazioni fino alla data di scadenza specificata sulle etichette del kit. Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza.
8. Alcuni reagenti richiedono precauzioni di sicurezza. Per i dettagli, consultare la sezione sulle sostanze pericolose. Per informazioni più specifiche in materia di sicurezza, fare riferimento alle relative schede di sicurezza (SDS) di ciascun componente del prodotto, disponibili sul seguente sito web: www.sophiagenetics.com/docs/
9. Smaltire i reagenti contenenti sostanze chimiche potenzialmente pericolose in conformità alle linee guida della propria istituzione nonché alle normative locali e nazionali.
10. L'uso, la conservazione e lo smaltimento dei componenti del kit e dei campioni devono essere effettuati nel rispetto delle normative e delle linee guida nazionali e locali in materia di biosicurezza. Garantire la conformità a tutte le procedure di sicurezza e ai requisiti normativi pertinenti per proteggere il personale e l'ambiente.
11. Tutti i campioni umani, incluso il sangue intero, devono essere sempre manipolati come potenzialmente infettivi.
12. Per prevenire ustioni, evitare di toccare superfici calde sugli strumenti riscaldati utilizzati durante la procedura.
13. Per prevenire rischi di incendio, conservare e utilizzare tutti i reagenti infiammabili, come l'etanolo, lontano da fiamme libere e fonti di calore.
14. I reagenti vengono spediti con ghiaccio secco (anidride carbonica solida) per mantenere basse temperature. Maneggiare il ghiaccio secco con cautela, utilizzando sempre guanti isolanti e occhiali protettivi per evitare ustioni da freddo in caso di contatto. Non toccare il ghiaccio secco a mani nude. Garantire un'adeguata ventilazione durante l'apertura dei contenitori contenenti ghiaccio secco. Non inalare il gas rilasciato dal ghiaccio secco. Conservare il ghiaccio secco esclusivamente in contenitori isolanti non ermetici, per consentire la fuoriuscita sicura del gas.
15. Non utilizzare componenti danneggiati. Contattare l'assistenza (vedere i dettagli nella sezione 8 Assistenza) in caso di ricezione di componenti danneggiati.
16. 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.



5. Risoluzione dei problemi

Fare riferimento alla tabella seguente per la risoluzione dei potenziali problemi che possono insorgere durante il workflow.

OSSERVAZIONE	CAUSA POTENZIALE	AZIONE RACCOMANDATA
Bassa resa della libreria	Quantità di materiale utilizzata inferiore a quella raccomandata Scarsa qualità del campione di DNA Ridotta efficienza della reazione di frammentazione ed ERAT Ridotta efficienza della reazione di legatura Ridotta efficienza della reazione di PCR Clean-up con biglie inefficiente	Utilizzare le quantità di DNA raccomandate e seguire le linee guida per la qualificazione Verificare l'accuratezza dei metodi di quantificazione del DNA Verificare che i reagenti siano stati conservati e manipolati secondo le raccomandazioni del produttore Risospendere accuratamente le biglie paramagnetiche prima dell'uso Utilizzare etanolo fresco Lavorare su ghiaccio nelle fasi appropriate e utilizzare pipette multicanale come indicato
Distribuzione dimensionale della libreria al di fuori dell'intervallo target (200 bp – 800 bp)	Scarsa qualità del campione di DNA Input di DNA al di fuori dell'intervallo raccomandato DNA e/o reagenti non preparati o non mantenuti a 4 °C prima dell'uso Miscelazione inadeguata dei reagenti di frammentazione con il campione di DNA	Seguire le linee guida per la qualificazione del DNA Mantenere il gDNA diluito e i reagenti su ghiaccio fino al momento dell'uso Prima dell'uso, verificare che i reagenti siano completamente scongelati Verificare che i reagenti siano stati conservati e manipolati secondo le raccomandazioni del produttore Lavorare su ghiaccio nelle fasi appropriate e utilizzare pipette multicanale come indicato
Presenza di dimeri di adattatori	Quantità di DNA inferiore a quella raccomandata Scarsa qualità del campione di DNA Clean-up con biglie inefficiente	Utilizzare le quantità di DNA raccomandate e seguire le linee guida per la qualificazione Evitare di risospendere gli adattatori di legatura con il pre-mix di legatura prima della miscelazione con il prodotto di reazione di frammentazione Eseguire un'ulteriore fase di clean-up (nota: ciò può ridurre la resa della libreria)



6. Caratteristiche di prestazione

6.1.1 Tipo di campione

Per verificare che SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep generi librerie di sequenziamento di elevata qualità per tutti i tipi di campioni previsti, la dimensione media dei frammenti, la resa della libreria e l'uniformità di copertura sono state misurate su librerie generate a partire da diversi tipi di campione. Le librerie sono state preparate a partire da DNA estratto da sangue o da vari tessuti freschi congelati (68 campioni), tessuti FFPE (83 campioni) e midollo osseo (12 campioni). Per tutti i tipi di campione utilizzati, SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep ha generato librerie conformi alle soglie di accettazione predefinite.

6.1.2 Riproducibilità inter-laboratorio

La riproducibilità inter-laboratorio è stata valutata utilizzando campioni di riferimento caratterizzati, di origine germinale o somatica, processati con il kit SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep in 6 e 3 siti indipendenti, rispettivamente. L'uniformità di copertura e la dimensione dell'inserito sono state utilizzate come parametri analitici di valutazione per questo test. Per entrambi i tipi di campione utilizzati, SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep ha soddisfatto le soglie di accettazione predefinite.

6.1.3 Quantità di DNA in input

Per verificare le prestazioni di SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep utilizzando la quantità minima raccomandata di input, sono stati generati 24 campioni utilizzando 10 ng di materiale in input isolato da un campione di riferimento FFPE. La preparazione è stata eseguita da 2 operatori in un unico sito ed è stata ripetuta in 2 giorni differenti per tenere conto della riproducibilità intra-laboratorio. La resa della libreria, la dimensione e l'uniformità di copertura sono state utilizzate come parametri analitici di valutazione per questo test. Tutti i campioni hanno soddisfatto i requisiti prestazionali. Non è stata osservata alcuna riduzione delle prestazioni utilizzando la quantità minima raccomandata di DNA in input.

6.1.4 Riproducibilità tra diversi lotti di reagenti

Per verificare la qualità e la robustezza di SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep con l'utilizzo di diversi lotti di reagenti, è stata valutata la riproducibilità lotto-lotto. I campioni sono stati processati utilizzando 5 differenti lotti di reagenti per la preparazione delle librerie. La resa della libreria, la dimensione e l'uniformità di copertura sono state utilizzate come parametri analitici di valutazione per questo test. Tutti i lotti di SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep hanno soddisfatto i requisiti. Le variazioni tra i lotti sono risultate inferiori alle soglie di accettabilità predefinite per tutti i criteri di QC.

6.1.5 Contaminazione crociata tra campioni

Per valutare una potenziale contaminazione crociata in SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep, campioni femminili sono stati processati in pozzetti adiacenti di una strip da 8 provette come configurazione di riferimento. Due ulteriori strip da 8 provette, ciascuna contenente una miscela di campioni maschili e femminili distribuiti secondo uno schema a scacchiera, sono state processate utilizzando lo stesso metodo come configurazioni di test. Per garantire il massimo rigore nella valutazione della contaminazione, per ciascun campione è stato utilizzato l'input massimo raccomandato di DNA genomico. La copertura del cromosoma Y nei campioni femminili delle piastre di test è stata confrontata con quella della piastra di riferimento contenente esclusivamente campioni femminili, e un campione è stato considerato conforme se la copertura del cromosoma Y rientrava nella media ± 3 deviazioni standard (DS) della * media di riferimento. Tutti i campioni hanno soddisfatto i criteri di accettazione e non è stata rilevata alcuna variazione significativa della copertura del cromosoma Y tra i campioni femminili del set di test per la contaminazione crociata e quelli del set di riferimento.



6.1.6 Sostanze interferenti

L'impatto di potenziali interferenti è stato valutato analizzando le prestazioni di SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep in presenza di sostanze interferenti endogene ed esogene, utilizzando campioni di DNA derivati da sangue e FFPE. Le concentrazioni di test sono state selezionate in conformità alla norma CLSI EP37-ED1:2018, con un'ulteriore maggiorazione del 20% per garantire un margine di sicurezza del saggio. La resa della libreria, la dimensione e l'uniformità di copertura sono state utilizzate come parametri analitici di valutazione per questo test. Tutti i campioni hanno soddisfatto i requisiti prestazionali, senza evidenza di interferenze sull'assay.

INTERFERENTE (CONCENTRAZIONE)	TIPO	TIPO DI CAMPIONE	NUMERO DI REPLICATI	NUMERO DI REPLICATI NON CONFORMI	ESITO
Albumina (72 mg/ml)	Endogeno	Sangue	10	0	Nessuna interferenza
Emoglobina (12 mg/ml)	Endogeno	Sangue	10	0	Nessuna interferenza
Bilirubina coniugata (0,5 mg/ml)	Endogeno	Sangue	10	0	Nessuna interferenza
Trigliceridi (18 mg/ml)	Endogeno	Sangue	10	0	Nessuna interferenza
EDTA (9 mg/ml)	Esogeno	Sangue	10	0	Nessuna interferenza
Emoglobina (0,5 mg/ml)	Endogeno	FFPE	10	0	Nessuna interferenza
Etanolo (5% del volume totale)	Esogeno	FFPE	10	0	Nessuna interferenza
Proteinasi K (0,6 mg/ml)	Esogeno	FFPE	10	0	Nessuna interferenza
Tampone di lavaggio 2 (1,875% del volume totale)	Esogeno	FFPE	10	0	Nessuna interferenza



7. Simboli

SIMBOLO	TITOLO
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Numero di catalogo
	Codice lotto (numero di lotto)
	Attenzione
	Produttore
	Data di produzione
	Limite di temperatura
	Data di scadenza
	Marcatura CE: Conformità europea
	Dispositivo medico per diagnostica in vitro
	Importatore
	Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Unione europea
	Contiene un numero sufficiente per <n> test
	Indossare dei guanti protettivi
	Indossare degli occhiali di sicurezza



	Indossare un camice da laboratorio
	Fare riferimento alla sezione Avvertenze e precauzioni
	Fare riferimento alla sezione Avvertenze e precauzioni



8. Supporto

In caso di difficoltà nell'utilizzo di SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep , consultare la sezione di risoluzione dei problemi nel documento oppure contattare il servizio di assistenza telefonica al numero +41 21 694 10 60, via e-mail all'indirizzo support@sophiagenetics.com o tramite il [portale di assistenza clienti](#). Visitare il sito www.sophiagenetics.com per maggiori dettagli.

Non utilizzare componenti danneggiati. Contattare il team di assistenza in caso di dubbi o problemi relativi ai kit.



9. Appendici

9.1 Appendice I: Piastre primer per doppio indice univoco

9.1.1 96A Unique Dual Index Primer Plate, formato piastra a 96 pozzetti (7 µl ciascuno) – Piastra A (IPdCUdIpA96)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	sgU DI- 1	sgU DI- 9	sgU DI- 17	sgU DI- 25	sgU DI- 33	sgU DI- 41	sgU DI- 49	sgU DI- 57	sgU DI- 65	sgU DI- 73	sgU DI- 81	sgU DI- 89
B	sgU DI- 2	sgU DI- 10	sgU DI- 18	sgU DI- 26	sgU DI- 34	sgU DI- 42	sgU DI- 50	sgU DI- 58	sgU DI- 66	sgU DI- 74	sgU DI- 82	sgU DI- 90
C	sgU DI- 3	sgU DI- 11	sgU DI- 19	sgU DI- 27	sgU DI- 35	sgU DI- 43	sgU DI- 51	sgU DI- 59	sgU DI- 67	sgU DI- 75	sgU DI- 83	sgU DI- 91
D	sgU DI- 4	sgU DI- 12	sgU DI- 20	sgU DI- 28	sgU DI- 36	sgU DI- 44	sgU DI- 52	sgU DI- 60	sgU DI- 68	sgU DI- 76	sgU DI- 84	sgU DI- 92
E	sgU DI- 5	sgU DI- 13	sgU DI- 21	sgU DI- 29	sgU DI- 37	sgU DI- 45	sgU DI- 53	sgU DI- 61	sgU DI- 69	sgU DI- 77	sgU DI- 85	sgU DI- 93
F	sgU DI- 6	sgU DI- 14	sgU DI- 22	sgU DI- 30	sgU DI- 38	sgU DI- 46	sgU DI- 54	sgU DI- 62	sgU DI- 70	sgU DI- 78	sgU DI- 86	sgU DI- 94
G	sgU DI- 7	sgU DI- 15	sgU DI- 23	sgU DI- 31	sgU DI- 39	sgU DI- 47	sgU DI- 55	sgU DI- 63	sgU DI- 71	sgU DI- 79	sgU DI- 87	sgU DI- 95
H	sgU DI- 8	sgU DI- 16	sgU DI- 24	sgU DI- 32	sgU DI- 40	sgU DI- 48	sgU DI- 56	sgU DI- 64	sgU DI- 72	sgU DI- 80	sgU DI- 88	sgU DI- 96

9.1.2 Sequenze di indice per i primer Unique Dual Index

La tabella seguente riporta le sequenze degli indici. Si noti che, quando si utilizzano Sample Sheet manuali, i seguenti strumenti Illumina® richiedono l'**orientamento reverse complement** della sequenza i5:

- NextSeq® 500/550
- NextSeq® 1000/2000 in modalità Standalone (Sample Sheet v1)
- HiSeq® 3000/4000/X
- NovaSeq™ 6000 con kit di reagenti v1.5 e NovaSeq™ X/X Plus
- MiniSeq™ (eccetto quando utilizzato con Rapid Reagent Kits)
- iSeq™ 100



Tutti gli altri strumenti Illumina® (ad es. MiSeq®) e le relative configurazioni richiedono l'orientamento **forward** della sequenza i5.



Queste informazioni sono soggette a modifiche. Fare sempre riferimento alle pagine di supporto Illumina® per le informazioni più aggiornate sui sistemi di sequenziamento che richiedono la sequenza dell'indice i5 in orientamento forward o reverse complement:

<https://support-docs.illumina.com/SHARE/AdapterSequences/Content/SHARE/AdapterSeq/Overview.htm>

INDICE	SEQUENZA i5 (ORIENTAMENTO FORWARD)	SEQUENZA i5 (ORIENTAMENTO REVERSE COMPLEMENT)	SEQUENZA i7
sgUDI-1	CGGTTCAA	TTGAACCG	GACTTCCT
sgUDI-2	TTCGTGAA	TTCACGAA	AGTCGATG
sgUDI-3	ATACCTGC	GCAGGTAT	CTGTCCAC
sgUDI-4	TGTAACCG	CGGTTACA	GCGAATTG
sgUDI-5	GCTTCGCT	AGCGAAGC	GGTGCTTA
sgUDI-6	GAACGATC	GATCGTTC	TCATAGGT
sgUDI-7	TGGCACCT	AGGTGCCA	ATGTCGCA
sgUDI-8	GACTGGCT	AGCCAGTC	CTCAAGTG
sgUDI-9	TCGGTTAT	ATAACCGA	TGAATCGT
sgUDI-10	ATGATCAC	GTGATCAT	TCGCCTTA
sgUDI-11	CATGACGA	TCGTCATG	GATGGAAC
sgUDI-12	CCAGCATG	CATGCTGG	ACGGTGGA
sgUDI-13	CGAGCATA	TATGCTCG	TCCTTGCG
sgUDI-14	CACTCGCA	TGCGAGTG	CTGCATGT
sgUDI-15	TCTAGTAC	GTAAGTAGA	AGCGGCAA
sgUDI-16	GTGCACGT	ACGTGCAC	CAAGTCGA
sgUDI-17	GGCATAGA	TCTATGCC	GCTACATC
sgUDI-18	AATCTTGG	CCAAGATT	TGAAGCAA
sgUDI-19	GATGCAAG	CTTGCATC	GGTGGATA
sgUDI-20	GACTACTG	CAGTAGTC	TTGATGGC
sgUDI-21	CACGTGGA	TCCACGTG	GTGCATCT
sgUDI-22	CCGATGAG	CTCATCGG	CACTCAGC
sgUDI-23	ATGCGTCT	AGACGCAT	AGATCTGG



INDICE	SEQUENZA i5 (ORIENTAMENTO FORWARD)	SEQUENZA i5 (ORIENTAMENTO REVERSE COMPLEMENT)	SEQUENZA i7
sgUDI-24	TGATGCTC	GAGCATCA	TCTTGCAA
sgUDI-25	GTTAACGG	CCGTTAAC	CTCATTCA
sgUDI-26	ATACGGTA	TACCGTAT	TTCGAGCT
sgUDI-27	TTGCCATC	GATGGCAA	GCTCATAG
sgUDI-28	AGCCGTAC	GTACGGCT	AGAACCTC
sgUDI-29	CCGGTCTT	AAGACCGG	TTGACCGA
sgUDI-30	GAGTAACA	TGTTACTC	GACTGACA
sgUDI-31	CCAGGTTA	TAACCTGG	CACGTATC
sgUDI-32	CGTTAATG	CATTACG	TCGAGCGA
sgUDI-33	GTTGGAAG	CTTCCAAC	TGCCACTC
sgUDI-34	AGGCTCGT	ACGAGCCT	AGTGCTGG
sgUDI-35	TACTCGAA	TTCGAGTA	GCATAGCT
sgUDI-36	TTCAGACC	GGTCTGAA	CTAGCGAG
sgUDI-37	TGAGTTCT	AGAACTCA	TACCGACC
sgUDI-38	TCATGATG	CATCATGA	ATGCTTGG
sgUDI-39	GAGGTCGA	TCGACCTC	GATCGGTT
sgUDI-40	CTGCATCG	CGATGCAG	CCGACTCA
sgUDI-41	AGTACAAG	CTTGTAAT	GGATACAT
sgUDI-42	TACTAGTC	GACTAGTA	ATGGTAGG
sgUDI-43	GTCGTATG	CATACGAC	ACCATAGC
sgUDI-44	CAAGGTAT	ATACCTTG	TGCGTCCA
sgUDI-45	ACGCAGGA	TCCTGCGT	AGACCTAT
sgUDI-46	TCGTGGCT	AGCCACGA	TCTTGCTG
sgUDI-47	ATTATCGC	GCGATAAT	CATCACTC
sgUDI-48	CGTACCAG	CTGGTACG	GTGAAGTA
sgUDI-49	GCTCACTG	CAGTGAGC	ACCAAGGA
sgUDI-50	CAGGATTG	CAATCCTG	CAGACCTG
sgUDI-51	GTCTAGTT	AACTAGAC	CGAGCAAC
sgUDI-52	TGAATGGC	GCCATTCA	TCTTGACT
sgUDI-53	ACGACAAT	ATTGTCGT	GACAATGG
sgUDI-54	GAACGCCA	TGGCGTTC	GTTCTACG



INDICE	SEQUENZA i5 (ORIENTAMENTO FORWARD)	SEQUENZA i5 (ORIENTAMENTO REVERSE COMPLEMENT)	SEQUENZA i7
sgUDI-55	CTGTCCTG	CAGGACAG	AACGCTGC
sgUDI-56	ATAAGGAC	GTCCTTAT	GGACATCA
sgUDI-57	TACATTCC	GGAATGTA	TTGAGCTC
sgUDI-58	GGTTAGCT	AGCTAACC	ACGTTGAG
sgUDI-59	CCTGCTGA	TCAGCAGG	CTTCAGGA
sgUDI-60	CCTCAATC	GATTGAGG	TGCCAACT
sgUDI-61	CGAAGAAT	ATTCTTCG	AGGTCATG
sgUDI-62	TAGTCGAG	CTCGACTA	TACTAGCA
sgUDI-63	ATCCTCAC	GTGAGGAT	GTAAGTGT
sgUDI-64	GCTGCAGT	ACTGCAGC	TGAGTTGA
sgUDI-65	GGCAATCG	CGATTGCC	CCTTAGAC
sgUDI-66	GCATCTTA	TAAGATGC	TATCGCCA
sgUDI-67	GTGCTGAA	TTCAGCAC	GCAGAACA
sgUDI-68	ATTGACGC	GCGTCAAT	AGGAATGC
sgUDI-69	GCCGCATT	AATGCGGC	CGTGAGGT
sgUDI-70	TGTAGTCA	TGACTACA	CAATTGAG
sgUDI-71	TCCTCCGA	TCGGAGGA	GGTCCTTC
sgUDI-72	CAATCGAG	CTCGATTG	TTCCGGCA
sgUDI-73	TAAGTCCG	CGGACTTA	ATGCCTGA
sgUDI-74	GGACAGTT	AACTGTCC	TCCAGGAC
sgUDI-75	TTGAGTGA	TCACTCAA	GCTGTCAC
sgUDI-76	CGTAACAT	ATGTTACG	CGACGATT
sgUDI-77	TACGCAGT	ACTGCGTA	TCGCAACG
sgUDI-78	ACCTGACC	GGTCAGGT	GAGTTGTA
sgUDI-79	CCACCTGA	TCAGGTGG	CGCTAAGG
sgUDI-80	TCACCGTG	CACGGTGA	TTGCGTGC
sgUDI-81	GTCTGGAA	TTCCAGAC	CAAGACTA
sgUDI-82	CGAACTCC	GGAGTTCG	CAATTGGT
sgUDI-83	AAGCTCAT	ATGAGCTT	ACTAGCAA
sgUDI-84	CTTGAACG	CGTTC AAG	GATCCACG
sgUDI-85	ATCGTAGA	TCTACGAT	GTCGCTTC



INDICE	SEQUENZA i5 (ORIENTAMENTO FORWARD)	SEQUENZA i5 (ORIENTAMENTO REVERSE COMPLEMENT)	SEQUENZA i7
sgUDI-86	TGACGATG	CATCGTCA	CCTAACGA
sgUDI-87	GCTGATAA	TTATCAGC	TGGCCACT
sgUDI-88	CTCATGTC	GACATGAG	ACAAGGTG
sgUDI-89	CGATGCGT	ACGCATCG	GACAGCAA
sgUDI-90	AAGACTCA	TGAGTCTT	AAGTTCGA
sgUDI-91	CGGTTGTC	GACAACCG	ACTCGCTC
sgUDI-92	ATCGCTAC	GTAGCGAT	GACGTAAAC
sgUDI-93	GATAGACG	CGTCTATC	TTGCCTGT
sgUDI-94	TGATCCGA	TCGGATCA	GGAGTCGA
sgUDI-95	CCTATTAG	CTAATAGG	CGGAATCG
sgUDI-96	CGCCACTT	AAGTGGCG	ACGTCGGT

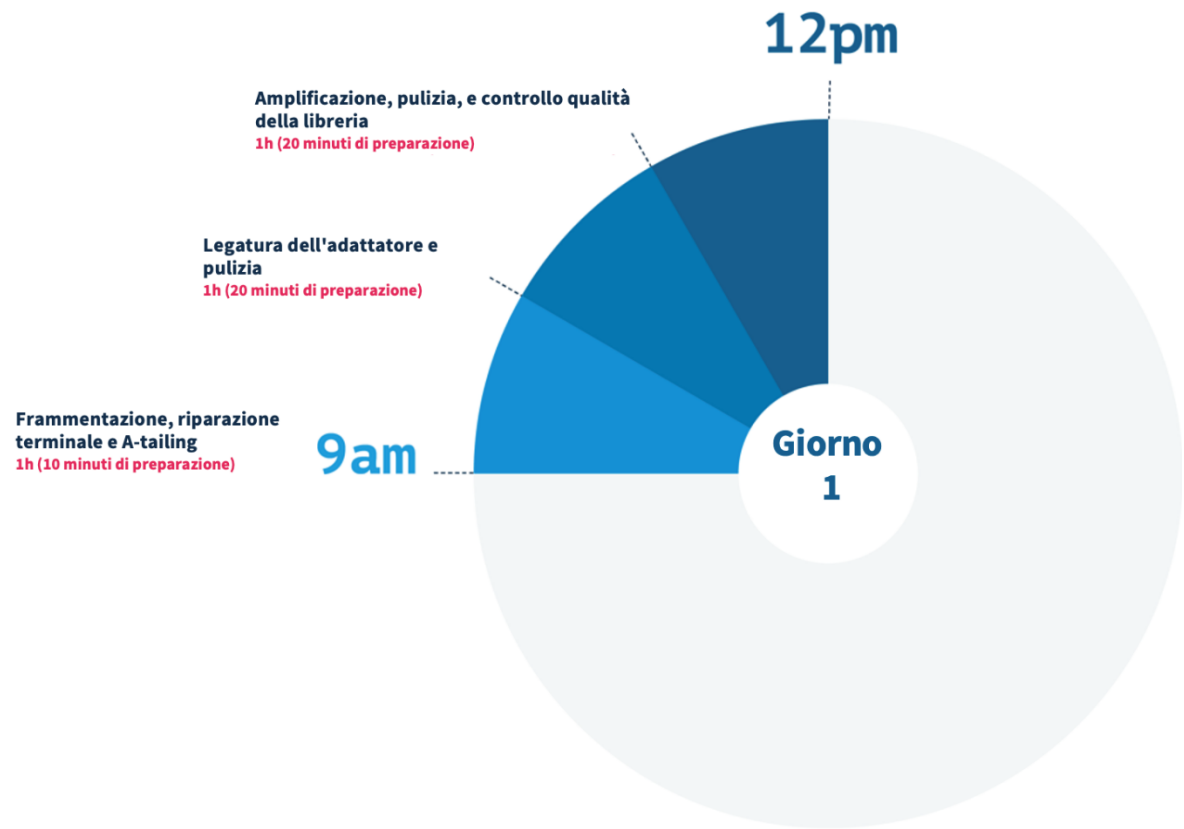


9.1.3 Diluizioni di caricamento per sequenziatori

TIPO DI SEQUenziATORE	DILUIZIONE DEL DOSAGGIO
Illumina® NextSeq® 500/550	1.3 pM (Kit Mid-Output) 1.4 pM (Kit High-Output) <i>Nota:</i> Regolare la diluizione (intervallo da 1,1 pM a 1,5 pM) in base al numero di cluster ottenuti nel primo studio
Illumina® NextSeq® 1000/2000	1000 pM (Denaturazione/Diluizione on-board) 100 pM (Denaturazione/Diluizione manuale) <i>Nota:</i> La denaturazione/diluizione manuale non è stata testata internamente da SOPHiA GENETICS
Illumina® HiSeq®	10 pM
Illumina® MiSeq®	10 pM
Illumina® MiniSeq™	1,4 pM (Standard Kit) 1,6 pM (Kit rapido)
Illumina® NovaSeq™ 6000	300 pM



9.2 Appendice II: Workflow generale di SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep



Preparazione delle librerie con SOPHiA GENETICS™ Dx Universal Library Prep



© SOPHiA GENETICS 2026. TUTTI I DIRITTI RISERVATI.

Document Approvals
Approved Date: 27 Jan 2026

Approval Verdict: Approve	Jonathan Day, (jday@sophiagenetics.com) Regulatory Approval 27-Jan-2026 08:32:58 GMT+0000
QA Approval Verdict: Approve	Nora Kormos, Quality Specialist (nkormos@sophiagenetics.com) Quality Assurance Approval 27-Jan-2026 08:54:54 GMT+0000