

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

16, 32, 48 E 96 AMOSTRAS

SOPHiA DDM™ Dx **Myeloid Solution**



Para utilização em diagnóstico in vitro
(IVD)

Não para autodiagnóstico





INFORMAÇÕES RESUMIDAS

Nome do produto	SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution
Tipo de produto	Solução em pacote
Família de produtos	Aplicação de diagnóstico molecular (kit + analítica)
ID do algoritmo	ILL1XG1S9_CNV
ID do painel de genes	MYS_v1
Versão do produto	1.0
Tipo de amostra	ADN somático isolado do sangue
Sequenciador	Illumina - MiSeq
Descrição do GMDN	Kit de reagentes para IVD / Software de interpretação da análise genómica humana
ID do documento	SG-08857
Versão do documento	v1.0
Data de revisão	30 de Janeiro de 2026

Estas Instruções de utilização são aplicáveis a todas as versões do SOPHiA DDM™ Dx.
 Leia atentamente as instruções de utilização antes de utilizar este produto.



SOPHiA GENETICS SA
 ZA La Pièce 12
 1180 Rolle
 Suíça



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



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





CÓDIGOS DE PRODUTOS

	CÓDIGO COMPLETO DO PRODUTO	BOX 1	BOX 2	KIT DE PREPARAÇÃO DE BIBLIOTECAS
REF	BS0103ILLCSML01-016	B1.01.0003.C-16	B2.0003.C-16	700232
	BS0103ILLCSML01-032	B1.01.0003.C-32	B2.0003.C-32	700232
	BS0103ILLCSML01-048	B1.01.0003.C-48	B2.0003.C-48	700234
	BS0103ILLCSML01-96	B1.01.0003.C-96	B2.0003.C-48	700234



DECLARAÇÃO DE EXONERAÇÃO DE RESPONSABILIDADE

O presente documento e o seu conteúdo são propriedade da SOPHiA GENETICS SA e das suas filiais ("SOPHiA GENETICS") e destinam-se exclusivamente à utilização contratual pelo seu cliente no âmbito da utilização do(s) produto(s) aqui descrito(s) e a nenhum outro fim. Este documento e o seu conteúdo não devem ser utilizados ou distribuídos para qualquer outro fim e/ou comunicados, divulgados ou reproduzidos, ou referenciados de qualquer forma, sem o consentimento prévio por escrito da SOPHiA GENETICS.

A SOPHiA GENETICS não concede qualquer licença ao abrigo dos seus direitos de patente, de marca comercial, de direitos de autor ou de direito consuetudinário, nem de direitos semelhantes de terceiros, através do presente documento. As instruções contidas neste documento devem ser rigorosa e explicitamente seguidas por pessoal qualificado e com formação adequada para garantir a utilização correta e segura do(s) produto(s) aqui descrito(s). Todo o conteúdo deste documento deve ser lido e compreendido na íntegra antes de utilizar o(s) produto(s) em causa.

A NÃO LEITURA COMPLETA E O NÃO CUMPRIMENTO EXPLÍCITO DE TODAS AS INSTRUÇÕES AQUI CONTIDAS PODEM RESULTAR EM DANOS NO(S) PRODUTO(S), FERIMENTOS EM PESSOAS, INCLUINDO UTILIZADORES OU OUTROS, E DANOS NOUTROS BENS.

A SOPHiA GENETICS NÃO ASSUME QUALQUER RESPONSABILIDADE DECORRENTE DA UTILIZAÇÃO INADEQUADA DO(S) PRODUTO(S) AQUI DESCRITOS (INCLUINDO PARTES DO MESMO OU SOFTWARE).

MARCAS COMERCIAIS

Illumina® e MiSeq® são marcas comerciais registadas da Illumina, Inc.

AMPure® e Agencourt® são marcas comerciais registadas da Beckman Coulter, Inc.

Qubit® e Dynabeads® são marcas comerciais registadas da Thermo Fisher Scientific Inc.

KAPA™ é uma marca comercial da Roche.

QIAseq® é uma marca comercial registada da Qiagen.

SOPHiA GENETICS™ e SOPHiA DDM™ Dx são marcas comerciais da SOPHiA GENETICS SA e/ou da(s) sua(s) afiliada(s) nos EUA e/ou noutros países. Todos os outros nomes, logótipos e outras marcas comerciais são propriedade dos respetivos proprietários. A NÃO SER QUE ESPECIFICAMENTE IDENTIFICADA COMO TAL, A UTILIZAÇÃO PELA SOPHiA GENETICS DE MARCAS COMERCIAIS DE TERCEIROS NÃO INDICA QUALQUER RELAÇÃO, PATROCÍNIO OU APROVAÇÃO ENTRE A SOPHiA GENETICS E OS PROPRIETÁRIOS DESSAS MARCAS COMERCIAIS. Quaisquer referências feitas pela SOPHiA GENETICS a marcas comerciais de terceiros destinam-se a identificar os produtos e/ou serviços correspondentes de terceiros e serão consideradas como utilização leal nominativa ao abrigo do direito das marcas.



HISTÓRICO DE REVISÕES

ID/VERSÃO DO DOCUMENTO	DATA	Versão equivalente em inglês das instruções de utilização	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO
SG-08857 – 1.0	Janeiro de 2026	SG-00659 – 8.0	• Versão inicial



ÍNDICE

1. Utilização/finalidade prevista	8
2. Declaração geral do(s) princípio(s)/procedimento do teste	9
3. Componentes do produto	10
4. Materiais e métodos do kit	11
4.1. Considerações iniciais	11
4.1.1. Conteúdo do kit (16, 32, 48 ou 96 amostras)	11
4.1.2. Advertências e precauções	13
4.1.3. Material necessário (não fornecido)	15
4.2. Preparação da biblioteca	17
4.2.1. Preparação de ADN genómico	17
4.2.2. Preparação de pré-misturas e reagentes	18
4.2.3. Fragmentação enzimática, reparação das extremidades e adenilação das extremidades 3'	20
4.2.4. Ligaçãõ	22
4.2.5. Limpeza pós-ligaçãõ	23
4.2.6. Seleção de tamanho duplo	25
4.2.7. Amplificação da biblioteca	26
4.2.8. Limpeza pós-amplificação	27
4.2.9. Quantificação de bibliotecas individuais e controlo de qualidade	28
4.3. Captura	29
4.3.1. Agrupamento de bibliotecas	29
4.3.2. Hibridação	30
4.3.3. Preparação das esferas de estreptavidina	32
4.3.4. Ligaçãõ dos alvos hibridizados às esferas	33
4.3.5. Lavar as esferas de estreptavidina para remover o ADN não ligado	33
4.3.6. Amplificação pós-captura	36
4.3.7. Limpeza da amplificação pós-captura	37
4.3.8. Quantificação final da biblioteca e controlo de qualidade	38
4.4. Sequenciação	39
4.4.1. Preparação da biblioteca para sequenciação	39
5. Procedimento de análise	40
5.1. Instruções de instalação do Modo SOPHiA DDM™ Dx	40
5.2. Descrição do fluxo de trabalho de análise para a geração de resultados de IVD	40
6. Limitações, advertências e precauções	41
7. Avaliação de desempenho não clínico	44
7.1. MÉTODOS	44
7.2. DADOS	46
7.3. CONCLUSÕES GERAIS	46
7.4. RESULTADOS	48



8. Símbolos	49
9. Suporte	50
Anexo 1. Placas adaptadoras de índice duplo	51
Anexo 2. Equipamento de laboratório utilizado no Laboratório da SOPHiA GENETICS	54
Anexo 3. Fluxo de trabalho geral - Soluções de captura do SOPHiA DDM™	56
Anexo 4. Lista das regiões-alvo e regiões assinaladas aplicáveis	58



1. UTILIZAÇÃO/FINALIDADE PREVISTA

O produto destina-se a ser utilizado para identificar variantes que ocorrem em 30 genes envolvidos em neoplasias mielóides, visando posições específicas propensas a mutações na sequência genómica. A função do produto é ajudar os profissionais de saúde a tomar uma decisão clínica relacionada com as neoplasias mielóides e fornecer uma fundamentação molecular para uma terapêutica adequada.

O produto destina-se a ser utilizado apenas para diagnóstico in vitro e para uso profissional.



2. DECLARAÇÃO GERAL DO(S) PRINCÍPIO(S)/PROCEDIMENTO DO TESTE

A função validada da análise SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution (MYS) consiste em analisar dados brutos de SNG gerados por um instrumento Illumina MiSeq® com o MiSeq® Reagent Kit v3, em amostras somáticas isoladas do sangue com o KAPA® Library Amplification Kit e o SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I.

O SOPHiA DDM™ Dx MYS envolve três etapas principais. A primeira etapa consiste em qualificar a amostra de ADN do sangue que pode ser utilizada para o teste. A segunda é preparar manualmente as amostras para sequenciação, o que se designa por preparação da biblioteca. A preparação da biblioteca consiste em sete passos fundamentais: fragmentação do ADN, ligação de adaptadores, amplificação por PCR de bibliotecas individuais, agrupamento de bibliotecas, hibridação de sondas, amplificação por PCR de captura e pós-captura. O terceiro procedimento consiste em sequenciar a amostra preparada utilizando a química SBS (sequenciação por síntese) no sequenciador Illumina MiSeq®.

Para análise, os resultados devem ser carregados para a plataforma SOPHiA DDM™ e analisados utilizando a aplicação SOPHiA DDM™ Dx MYS.

Tabela 1: lista de genes visados pelo produto

ABL1	FLT3	PTPN11
ASXL1	HRAS	RUNX1
BRAF	IDH1	SETBP1
CALR	IDH2	SF3B1
CBL	JAK2	SRSF2
CEBPa	KIT	TET2
CSF3R	KRAS	TP53
DNMT3A	MPL	U2AF1
ETV6	NPM1	WT1
EZH2	NRAS	ZRSR2



3. COMPONENTES DO PRODUTO

O SOPHiA DDM™ Dx MYS é composto por dois componentes: o kit de SNG e o pipeline bioinformático utilizado em combinação com um acessório IVD, o modo SOPHiA DDM™ Dx baseado na nuvem.

- O objetivo do kit de SNG (sequenciação de nova geração) é preparar e enriquecer bibliotecas de ADN a partir de amostras de sangue adequadas para sequenciação num sequenciador Illumina® MiSeq®. O kit de SNG permite aos utilizadores gerar dados de sequenciação orientada. Os elementos são descritos na secção 5. Materiais e métodos do kit - 5.1. Considerações iniciais - 5.1.1 Conteúdo do kit.
- O pipeline bioinformático ("pipeline MYS") processa os dados brutos de SNG através de algoritmos capazes de avaliar a integridade genómica.
- O modo SOPHiA DDM™ Dx é uma aplicação front-end baseada na Web disponível como um "software como serviço" (SaaS) utilizada para gerar um relatório descarregável para os genes mencionados na Tabela 1 para variantes de nucleotídeos únicos [Single Nucleotide Variants (SNV)] e inserções e deleções [Insertions and Deletions (INDEL)]. Aplicam-se limitações - consulte a secção 7 - Limitações, advertências e precauções.



4. MATERIAIS E MÉTODOS DO KIT

4.1. Considerações iniciais

Certifique-se de que todos os tubos estão fisicamente intactos e armazenados de acordo com as temperaturas recomendadas, após a receção, para um desempenho ótimo do kit. O manuseamento e o armazenamento inadequados dos componentes do kit noutras condições podem afetar negativamente o desempenho do kit.

4.1.1. Conteúdo do kit (16, 32, 48 ou 96 amostras)

Rode sempre os tubos por breves instantes antes de os utilizar para recolher todo o líquido.

Dependendo do formato do kit, são fornecidos os seguintes componentes:

COMPONENTE	NÚMERO DE ARTIGOS CONSOANTE O FORMATO DO KIT			
	16 amostras kit	32 amostras kit	48 amostras kit	96 amostras kit
BOX 1	1	1	1	2 (48 amostras cada)
Adaptadores compatíveis com Illumina® com índice duplo (num formato de placa de 96 poços incluído na Caixa 1)	32	32	48	96 (Placa contida numa das duas Caixas 1)
BOX 2	1	1	1	2 (48 amostras cada)
SOPHiA GENETICS™ ADN Library Prep Kit I	1	2 (16 amostras cada)	1	2 (48 amostras cada)

BOX 1 (CONSERVAR A UMA TEMPERATURA ENTRE -25 °C E -15 °C)

- Universal Blockers - TS Mix (12 µl)
- Human Cot DNA (25 µl)
- Myeloid Solution probes by SOPHiA GENETICS (18 µl)
- 2x Hybridization Buffer (75 µl)
- Hybridization Buffer Enhancer (30 µl)
- 2x Bead Wash Buffer (1250 µl)
- 10x Stringent Wash Buffer (200 µl)
- 10x Wash Buffer I (160 µl)
- 10x Wash Buffer II (110 µl)



- 10x Wash Buffer III (110 µl)
- Dependendo do formato do kit: 32, 48 ou 96 adaptadores compatíveis com Illumina® com índice duplo num formato de placa de 96 poços (7 µl cada): consulte o Anexo 1 para ver a apresentação e as sequências dos adaptadores.

BOX 2 (CONSERVAR A UMA TEMPERATURA ENTRE +2 °C E +8 °C)

- Dynabeads® M-270 Streptavidin (440 µl)
- Agencourt® AMPure® XP (3 x 1,5 ml para 16 amostras, 8,7 ml para 32 amostras e 11,6 ml para 48 amostras; ver Nota para 96 amostras)
- IDTE Low TE Buffer (10 ml)
- Nuclease-free water (20 ml)

Nota: Para 96 amostras, é fornecida duas vezes a Caixa 2 de 48 amostras (ver tabela na página anterior).



Importante: Consulte as Advertências e precauções abaixo para mais pormenores.

SOPHiA GENETICS™ DNA LIBRARY PREP KIT I (CONSERVAR ENTRE -25 °C E -15 °C)

- Para 32 amostras, são fornecidos dois kits de 16 amostras.
- Para 96 amostras, são fornecidos dois kits de 48 amostras.

COMPONENTES	FORMATO DO KIT	
	kit de 16 amostras	kit de 48 amostras
HiFi PCR Master Mix 2x (em µl)	500	1560
Primer Mix Illumina® Library Amp (em µl)	30	95
FX Enzyme Mix (em µl)	200	625
FX Buffer 10x (em µl)	100	315
FX Enhancer (em µl)	100	315
DNA Ligase (em µl)	200	625
DNA Ligase Buffer 5x (em µl)	400	1250



Importante: Consulte as Advertências e precauções abaixo para mais pormenores.



4.1.2. Advertências e precauções

Nome do produto	Pictograma do GHS	Frases H/P	Palavra-sinal	Componente perigoso
2X Hybridization Buffer		• H300 Mortal por ingestão. • H311 Tóxico em contacto com a pele. • H315 Provoca irritação cutânea. • H370 Afeta os órgãos. • H370 Afeta os órgãos (sistema nervoso central). • H411 Tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. • P260 Não respirar os vapores/aerossóis. • P264 Lavar a pele contaminada cuidadosamente após manuseamento. • P270 Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto. • P273 Evitar a libertação para o ambiente. • P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. • P301+P310 Em caso de ingestão: contacte imediatamente um centro de informação antivenenos/médico. • P302+P352 Se entrar em contacto com a pele: lavar abundantemente com água. • P308+P311 Em caso de exposição ou suspeita de exposição: Contacte um centro de informação antivenenos ou um médico. • P321 Tratamento específico (ver aconselhamento médico no presente rótulo). • P330 Enxaguar a boca. • P332+P313 Em caso de irritação cutânea: consulte um médico. • P362+P364 Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar. • P391 Recolher o produto derramado. • P405 Armazenar em local fechado à chave. • P501 Eliminar o conteúdo/recipiente em conformidade com a regulamentação nacional.	Perigo	Cloreto de tetrametilamónio Concentração: 49% CAS: 75-57-0
Hybridization Buffer Enhancer		• H351 Suspeito de provocar cancro. • H360 Pode afetar a fertilidade ou o nascituro. • H373 Pode afetar os órgãos após exposição prolongada ou repetida.	Perigo	Formamida Concentração: 100% CAS: 75-12-7



Nome do produto	Pictograma do GHS	Frases H/P	Palavra-sinal	Componente perigoso
		• P201 Pedir instruções específicas antes da utilização. • P202 Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança. • P260 Não respirar os vapores/aerossóis. • P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. • P308+P313 EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico. • P314 Em caso de indisposição, consulte um médico. • P405 Armazenar em local fechado à chave. • P501 Eliminar o conteúdo/recipiente em conformidade com a regulamentação nacional.		
10x Stringent Wash Buffer		• H302 Nocivo por ingestão. • H315 Provoca irritação cutânea. • H319 Provoca irritação ocular grave.	Perigo	Sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético Concentração: 2,5% CAS: 6381-92-6
10x Wash Buffer I		• H228 Sólido inflamável. • H302 Nocivo por ingestão. • H315 Provoca irritação cutânea. • H318 Provoca lesões oculares graves. • H332 Nocivo por inalação. • H401 Tóxico para os organismos aquáticos. • H402 Nocivo para os organismos aquáticos. • H412 Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. • P273 Evitar a libertação para o ambiente. • P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. • P305+P351+P338: se entrar em contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. • P310 Contacte imediatamente um centro de informação antivenenos/médico. • P501 Eliminar o conteúdo/recipiente em conformidade com a regulamentação nacional.	Perigo	Dodecilsulfato de sódio Concentração: 4,9% CAS: 151-21-3



Nome do produto	Pictograma do GHS	Frases H/P	Palavra-sinal	Componente perigoso
DNA Ligase Buffer 5x		- H335 Pode provocar irritação das vias respiratórias. - P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial/proteção auditiva.	Aviso	poli(etilenoglicol) Concentração: 1-5% CAS: 9002-93-1

Utilize  e  como equipamento de proteção individual.

4.1.3. Material necessário (não fornecido)

MATERIAIS FORNECIDOS PELO UTILIZADOR (A ADQUIRIR SEPARADAMENTE)

- Kit de amplificação de bibliotecas KAPA™ KK2620 (Roche Cat. n.º: 07958978001)
- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sem RNase/DNase
- Tubos de 1,5 ml de ADN pouco ligante
- Tubos de 1,5 ml
- Tubos cónicos de 50 ml
- Pontas de filtro
- Etanol (grau de biologia molecular)
- Reagentes de sequenciação Illumina®

EQUIPAMENTO DE LABORATÓRIO

Para evitar a contaminação da amostra:

- Zona pré-PCR
 - Equipamento e reagentes de quantificação fluorométrica
 - Suporte de separação magnético (do tipo com 96 poços)
 - Pipetas multicanal (P10 ou P20; P100; P200)
 - Microcentrífuga de mesa (compatível com tiras de 8 tubos)
 - Termociclador (tampa aquecida programável)
 - Agitador tipo Vortex



- Zona pós-PCR
 - Sistema de eletroforese capilar
 - Concentrador de vácuo de ADN
 - Termobloco ou banho de água (compatível com tubos de 1,5 ml)
 - Equipamento e reagentes de quantificação fluorométrica
 - Suporte de separação magnético (compatível com tubos de 1,5 ml)
 - Suporte de separação magnético (do tipo com 96 poços)
 - Pipetas multicanal (P10 ou P20; P100; P200)
 - Microcentrífuga de mesa (compatível com tiras de 8 tubos)
 - Termociclador (tampa aquecida programável)
 - Agitador tipo Vortex



4.2. Preparação da biblioteca

4.2.1. Preparação de ADN genómico

MATERIAIS

- ADN genómico de cadeia dupla de alta qualidade (gDNA)
- FX Enhancer
- IDTE
- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sem RNase/DNase

IMPORTANTE

A integridade, concentração e pureza do ADN são fundamentais durante esta etapa. A pureza do ADN pode ser avaliada com um espectrofotómetro UV. Os rácios de absorvância recomendados situam-se entre 1,8-2,0 para o rácio 260/280 e entre 1,6-2,4 para 260/230. Recomendamos a confirmação da integridade da amostra por eletroforese capilar ou uma técnica equivalente. Para evitar erros na introdução de ADN, recomenda-se uma diluição inicial para obter uma concentração na gama de 50 a 100 ng/μl. A concentração de ADN deve ser confirmada por uma quantificação fluorométrica (por exemplo, Qubit®, Thermo Fisher) e o valor obtido deve ser utilizado para calcular a diluição final.

PREPARAÇÃO

Retire o FX Enhancer da conservação a -20 °C e descongele-o à temperatura ambiente. Após a descongelção, misture o reagente invertendo suavemente o tubo 5 vezes e centrifugue brevemente numa microcentrífuga.

Dependendo do formato do kit, o número de amostras de ADN a agrupar por reação de captura varia de acordo com a tabela seguinte. Este facto deve ser tido em consideração antes de começar.

FORMATO DO KIT	kit de 16 amostras	kit de 32 amostras	kit de 48 amostras	kit de 96 amostras*
Número de bibliotecas individuais por captura	4	8	12	12

* Para 96 amostras, são fornecidos dois kits de 48 amostras, que incluem 8 reações de captura.

PROCEDIMENTO

1. Prepare as seguintes tiras de PCR de acordo com o número de reações:

NÚMERO DE REAÇÕES	4	8	12	16	24	32	48
Tira de PCR	4 tubos	4 tubos	4 tubos	8 tubos	8 tubos	8 tubos	8 tubos
Número de tiras	1	2	3	2	3	4	6

2. Prepare uma diluição para cada amostra de ADN genómico (gDNA) de alta qualidade para o número adequado de tiras de PCR, da seguinte forma:



DILUIÇÃO DE gDNA	
gDNA	200 ng
IDTE	Complete até 30 µl

- Misture brevemente, pipetando suavemente para cima e para baixo 5 vezes, seguido de uma breve centrifugação numa microcentrífuga para recolher todo o líquido.



Sugestão: ponto de paragem seguro durante a noite a 4 °C.

- Consoante o número de amostras, proceda da seguinte forma:
 - Se estiver a processar **4 amostras**, adicione 5 µl de FX Enhancer a cada tubo da tira de 4 tubos que contém 30 µl de amostras de gDNA (total de 35 µl em cada tubo da tira de 4 tubos).
 - Se estiver a processar **8 ou mais amostras**, proceda da seguinte forma:
 - Para facilitar a pipetagem, crie um reservatório de FX Enhancer adicionando os seguintes volumes a um novo conjunto de tiras de 4 ou 8 tubos de acordo com o seguinte esquema:

NÚMERO DE REAÇÕES	8	12	16	24	32	48
Tira de PCR (1 tira)	4 tubos	4 tubos	8 tubos	8 tubos	8 tubos	8 tubos
FX Enhancer (em µl)	11,5	17,5	11,5	17,5	24	36

- Utilizando uma pipeta multicanal, adicione 5 µl do FX Enhancer dos tubos acima referidos aos 30 µl de amostras de gDNA (total de 35 µl em cada tubo das tiras de 4 ou 8 tubos).
- Utilizando uma pipeta multicanal regulada para 20 µl, misture suavemente pipetando para cima e para baixo 5 vezes e centrifugue brevemente numa microcentrífuga.

- Mantenha em gelo até à preparação da reação de fragmentação enzimática.

4.2.2. Preparação de pré-misturas e reagentes

COMPONENTES E REAGENTES

- FX Enzyme Mix
- FX Buffer 10x
- DNA Ligase Buffer 5x
- DNA Ligase
- HiFi PCR Master Mix 2x
- Primer Mix Illumina® Library Amp
- Água isenta de nuclease
- Esferas AMPure® XP
- Etanol

PREPARAÇÃO

- Retire os componentes do SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I da conservação a -20 °C e descongele-os em gelo.
- Retire a placa de adaptadores de índice duplo da conservação a -20 °C e coloque-a no frigorífico a 4 °C para utilização posterior.



- Retire as esferas AMPure® XP da conservação a 2-8 °C e deixe-as equilibrar à temperatura ambiente durante pelo menos 30 minutos.
- Prepare etanol fresco a 80% (volume de acordo com o seguinte esquema baseado no número de reações):

ETANOL A 80%							
Número de reações	4	8	12	16	24	32	48
Etanol a 80% (em ml)	10	20	30	30	40	50	70

- Quando os componentes do SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I estiverem descongelados, misture os reagentes invertendo o tubo 5-10 vezes e centrifugue brevemente numa microcentrífuga.

PRÉ-MISTURAS

1. Prepare a **Pré-mistura de reação FX** da seguinte forma:

PRÉ-MISTURA DE REAÇÃO FX							
Número de reações	4	8	12	16	24	32	48
FX Buffer 10x (em µl)	23,6	47,1	75	95	150	190	300
FX Enzyme Mix (em µl)	47,1	94,2	150	190	300	380	600

- Misture bem, pipetando para cima e para baixo 10 vezes e centrifugue brevemente.
- Conserve no gelo.

2. Prepare a **Pré-mistura de ligação** da seguinte forma:

PRÉ-MISTURA DE LIGAÇÃO							
Número de reações	4	8	12	16	24	32	48
DNA Ligation Buffer 5x (em µl)	95	190	300	380	600	760	1200
DNA Ligase (em µl)	47,5	95	150	190	300	380	600
Água isenta de nuclease (em µl)	71,3	142,5	225	285	450	570	900

- Misture bem, pipetando para cima e para baixo 10 vezes e centrifugue brevemente.
- Conserve no gelo.



Importante: o DNA Ligation Buffer é altamente viscoso; pipete suavemente e certifique-se de que obtém uma pré-mistura de Ligação homogênea.

3. Prepare a **Pré-mistura de PCR** da seguinte forma:



PRÉ-MISTURA DE PCR							
Número de reações	4	8	12	16	24	32	48
HiFi PCR Master Mix 2x (em µl)	115	230	345	460	690	920	1380
Primer Mix Illumina® Library Amp (em µl)	6,9	13,8	20,7	27,6	41,4	55,2	82,8
Água isenta de nuclease (em µl)	16,1	32,2	48,3	64,4	96,6	128,2	193,2

- Misture bem, pipetando para cima e para baixo 10 vezes e centrifugue brevemente.
- Conserve no gelo.

4.2.3. Fragmentação enzimática, reparação das extremidades e adenilação das extremidades 3'

MATERIAIS

- gDNA de cadeia dupla diluído e condicionado em 35 µl
- Pré-mistura de reação FX
- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sem RNase/DNase

PREPARAÇÃO

- Programe o termociclador para FX Fragmentation com as seguintes definições:

	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (MINUTOS)
Tampa	70	-
Etapa 1	4	1
Etapa 2	32	5
Etapa 3	65	30
Manter	4	∞

- Inicie o programa FX Fragmentation. Quando o bloco atingir a Etapa 1 (4 °C), faça uma pausa no programa.

PROCEDIMENTO



Importante: mantenha sempre as amostras e a pré-mistura em gelo antes e depois da incubação para bloquear a reação enzimática.

1. Consoante o número de amostras, proceda da seguinte forma:
 - Se estiver a processar **4 amostras**, avance para a etapa 2.



- Se estiver a processar **8 ou mais amostras**, para facilitar a pipetagem, crie um reservatório de pré-mistura de FX Reaction adicionando os seguintes volumes a um novo conjunto de tiras de 4 ou 8 tubos, de acordo com o seguinte esquema:

NÚMERO DE REAÇÕES	8	12	16	24	32	48
Tira de PCR (1 tira)	4 tubos	4 tubos	8 tubos	8 tubos	8 tubos	8 tubos
Pré-mistura de reação FX (em μ l)	33	52,5	33	52,5	66	105

2. Monte a reação da seguinte forma:

- Utilizando uma pipeta multicanal se estiver a processar 8 ou mais amostras, adicione 15 μ l de pré-mistura FX Reaction a cada um dos 35 μ l de amostras de gDNA (total de 50 μ l em tiras de 4 ou 8 tubos).
- Utilizando uma pipeta regulada para 40 μ l (multicanal, se processar 8 ou mais amostras), misture bem pipetando para cima e para baixo 5 vezes e centrifugue brevemente numa microcentrífuga.

3. Coloque no termociclador e prossiga com o programa FX Fragmentation.

Avance imediatamente para a ligação



4.2.4. Ligação

MATERIAIS

- Produtos da reação de FX fragmentation em 50 µl cada
- Pré-mistura de ligação
- Adaptadores de índice duplo
- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sem RNase/DNase

PREPARAÇÃO

- Retire a placa de Adaptadores de índice duplo de 4 °C (transferida de -20 °C para 4 °C anteriormente) e centrifugue brevemente a placa para recolher todo o líquido. Consulte o Anexo 1 para obter o respetivo formato de placa.
- Durante a FX fragmentation, prepare novas tiras de PCR com 5 µl de diferentes Adaptadores de índice duplo por tubo, de acordo com a sua estratégia de indexação, seguindo o seguinte esquema:

NÚMERO DE REAÇÕES	4	8	12	16	24	32	48
Tira de PCR	4 tubos	4 tubos	4 tubos	8 tubos	8 tubos	8 tubos	8 tubos
Número de tiras	1	2	3	2	3	4	6

- Configure o termociclador para 20 °C (abra a tampa)

PROCEDIMENTO

- Consoante o número de amostras, proceda da seguinte forma:
 - Se estiver a processar **4 amostras**, avance para a etapa 2.
 - Se estiver a processar **8 ou mais amostras**, para facilitar a pipetagem, crie um reservatório de pré-mistura de Ligação num novo conjunto de tiras de PCR, de acordo com o seguinte esquema:

NÚMERO DE REAÇÕES	8	12	16	24	32	48
Tira de PCR (1 tira)	4 tubos	4 tubos	8 tubos	8 tubos	8 tubos	8 tubos
Pré-mistura de ligação (em µl)	100	160	100	160	200	320

- Utilizando uma pipeta multicanal, transfira os 50 µl de cada produto da reação de FX fragmentation para as tiras de 4 ou 8 tubos que contêm 5 µl de Adaptadores de índice duplo.
- Misture bem, pipetando para cima e para baixo 10 vezes e centrifugue brevemente.
- Utilizando uma pipeta multicanal se estiver a processar 8 ou mais amostras, adicione 45 µl de Pré-mistura de ligação a cada produto da reação de FX fragmentation (55 µl em cada tubo da tira de 4 ou 8 tubos).
- Misture bem, pipetando para cima e para baixo 10 vezes e centrifugue brevemente.



6. Incube no termociclador a 20 °C durante 15 minutos (tampa aberta).



Importante: não coloque a(s) tira(s) em gelo no final da ligação, uma vez que isso pode diminuir a ligação do ADN às esferas.

Avance para a limpeza pós-ligação.

4.2.5. Limpeza pós-ligação

MATERIAIS

- Produtos da reação de ligação em 100 µl cada
- Esferas AMPure XP equilibradas à temperatura ambiente
- Etanol recém-preparado a 80%
- Água isenta de nuclease
- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sem RNase/DNase

PROCEDIMENTO

1. Utilizando uma pipeta multicanal, adicione 80 µl de esferas AMPure XP a cada um dos 100 µl de produtos da reação de ligação. Misture bem, pipetando para cima e para baixo 10 vezes.
2. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos e centrifugue brevemente para recolher todo o líquido.
3. Coloque a tira de 4 ou 8 tubos num suporte magnético em formato de placa de 96 poços durante 5 minutos ou até o líquido ficar transparente.
4. Elimine cuidadosamente 170 µl de sobrenadante utilizando uma pipeta multicanal.

Mantenha os tubos no suporte magnético para os passos seguintes.

5. Utilizando uma pipeta multicanal, adicione 170 µl de etanol a 80% às esferas. Incubar durante 30 segundos a 1 minuto.
6. Elimine cuidadosamente o etanol utilizando uma pipeta multicanal.
7. Repita os passos 5 e 6 uma vez.
8. Retire o etanol residual com uma pipeta multicanal P10 ou P20.
9. Seque as esferas à temperatura ambiente durante 5 minutos. Não seque demasiado as pérolas, pois isso pode diminuir a quantidade de ADN recuperado.

Retire os tubos do suporte magnético.

10. Utilizando uma pipeta multicanal, adicione 105 µl de água isenta de nuclease às esferas e aguarde alguns segundos.



Misture bem, pipetando para cima e para baixo 10 vezes. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos e centrifugue brevemente para recolher todo o líquido.

11. Coloque as tiras de 4 ou 8 tubos num suporte magnético em formato de placa de 96 poços durante 5 minutos ou até o líquido ficar transparente.
12. Utilizando uma pipeta multicanal, transfira cuidadosamente 100 μ l do sobrenadante para novas tiras de 4 ou 8 tubos rotulados.

Avance para a Seleção de tamanho duplo.



4.2.6. Seleção de tamanho duplo

MATERIAIS

- Produtos de reação ligados em 100 μ l cada
- Esferas AMPure XP equilibradas à temperatura ambiente
- Etanol recém-preparado a 80%
- IDTE
- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sem RNase/DNase

PROCEDIMENTO

1. Utilizando uma pipeta multicanal, adicione 60 μ l de esferas AMPure XP a cada um dos 100 μ l de produtos de reação ligados. Misture bem, pipetando para cima e para baixo 10 vezes.
2. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos e centrifugue brevemente para recolher todo o líquido.
3. Coloque as tiras de 4 ou 8 tubos num suporte magnético em formato de placa de 96 poços durante 5 minutos ou até o líquido ficar transparente.
4. Utilizando uma pipeta multicanal, transfira cuidadosamente 140 μ l do sobrenadante para novas tiras rotuladas de 4 ou 8 tubos contendo 20 μ l de esferas AMPure XP. Misture bem, pipetando para cima e para baixo 10 vezes.
5. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos e centrifugue brevemente para recolher todo o líquido.
6. Coloque as tiras de 4 ou 8 tubos num suporte magnético em formato de placa de 96 poços durante 3 minutos ou até o líquido ficar transparente.
7. Elimine cuidadosamente 150 μ l do sobrenadante utilizando uma pipeta multicanal.

Mantenha os tubos no suporte magnético para os passos seguintes.

8. Utilizando uma pipeta multicanal, adicione 170 μ l de etanol a 80% às esferas.
Deixe os tubos repousar durante 30 segundos a 1 minuto.
9. Elimine cuidadosamente o etanol utilizando uma pipeta multicanal.
10. Repita os passos 8 e 9 uma vez.
11. Retire o etanol residual com uma pipeta multicanal P10 ou P20.
12. Seque as esferas à temperatura ambiente durante 4 minutos. Não seque demasiado as pérolas, pois isso pode diminuir a quantidade de ADN recuperado.

Retire os tubos do suporte magnético.

13. Utilizando uma pipeta multicanal, adicione 20 μ l de IDTE às esferas. Misture bem, pipetando para cima e para baixo 10 vezes e centrifugue brevemente.

Avance para a Amplificação da biblioteca.



4.2.7. Amplificação da biblioteca

MATERIAIS

- Produtos de ligação selecionados de tamanho duplo e esferas ressuspensos em 20 µl de IDTE cada
- Pré-mistura de PCR

PREPARAÇÃO

Programa o termociclador para Amplificação da biblioteca com as seguintes definições:

	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (SEGUNDOS)	
Tampa	99	-	
Etapa 1: desnaturação inicial	98	120	
Etapa 2: desnaturação	98	20	8 ciclos
Etapa 3: hibridação	60	30	
Etapa 4: extensão	72	30	
Etapa 5: extensão final	72	60	
Manter	10	∞	

PROCEDIMENTO

- Consoante o número de amostras, proceda da seguinte forma:
 - Se estiver a processar **4 amostras**, avance para a etapa 2.
 - Se estiver a processar **8 ou mais amostras**, proceda da seguinte forma:
 - Para facilitar a pipetagem, crie um reservatório de pré-mistura de PCR adicionando os seguintes volumes a um novo conjunto de tiras de 4 ou 8 tubos, de acordo com o seguinte esquema:

NÚMERO DE REAÇÕES	8	12	16	24	32	48
Tira de PCR (1 tira)	4 tubos	4 tubos	8 tubos	8 tubos	8 tubos	8 tubos
Pré-mistura de PCR (em µl)	65	100	65	100	130	200

- Monte a reação da seguinte forma:
 - Utilizando uma pipeta multicanal se estiver a processar 8 ou mais amostras, adicione 30 µl de pré-mistura de PCR aos produtos de ligação selecionados de tamanho duplo e às esferas (volume total de 50 µl = 30 µl + 20 µl).
 - Misture bem, pipetando para cima e para baixo 10 vezes e centrifugue brevemente.



3. Coloque os tubos no termociclador e execute o programa Amplificação da biblioteca.



Sugestão: ponto de paragem seguro durante a noite a 4 °C.

4.2.8. Limpeza pós-amplificação

MATERIAIS

- Produtos da reação por PCR em 50 µl cada
- Esferas AMPure XP equilibradas à temperatura ambiente
- Etanol recém-preparado a 80%
- Água isenta de nuclease
- Tubos de baixa adsorção de ADN para armazenamento de bibliotecas

PROCEDIMENTO

1. Utilizando uma pipeta multicanal, adicione 50 µl de esferas AMPure XP a cada 50 µl de produto da PCR. Misture bem, pipetando para cima e para baixo 10 vezes.
2. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos e centrifugue brevemente para recolher todo o líquido.
3. Coloque as tiras de 4 ou 8 tubos num suporte magnético em formato de placa de 96 poços durante 5 minutos ou até o líquido ficar transparente.
4. Elimine cuidadosamente 90 µl de sobrenadante utilizando uma pipeta multicanal.

Mantenha os tubos no suporte magnético para os passos seguintes.

5. Utilizando uma pipeta multicanal, adicione 170 µl de etanol a 80% às esferas.
Deixe os tubos repousar durante 30 segundos a 1 minuto.
6. Elimine cuidadosamente o etanol utilizando uma pipeta multicanal.
7. Repita os passos 5 e 6 uma vez.
8. Retire o etanol residual com uma pipeta multicanal P10 ou P20.
9. Seque as esferas à temperatura ambiente durante 5 minutos. Não seque demasiado as pérolas, pois isso pode diminuir a quantidade de ADN recuperado.

Retire os tubos do suporte magnético.

10. Utilizando uma pipeta multicanal, adicione 20 µl de água isenta de nuclease às esferas. Misture bem, pipetando para cima e para baixo 10 vezes. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos e centrifugue para recolher todo o líquido.
11. Coloque a tira de 4 ou 8 tubos num suporte magnético em formato de placa de 96 poços durante 5 minutos ou até o líquido ficar transparente.
12. Transfira cuidadosamente 18 µl do sobrenadante (recomenda-se transferir duas vezes 9 µl neste passo) para um tubo de armazenamento de bibliotecas novo e rotulado.



Sugestão: Ponto de paragem seguro durante a noite a 4 °C ou -20 °C para conservação mais prolongada.



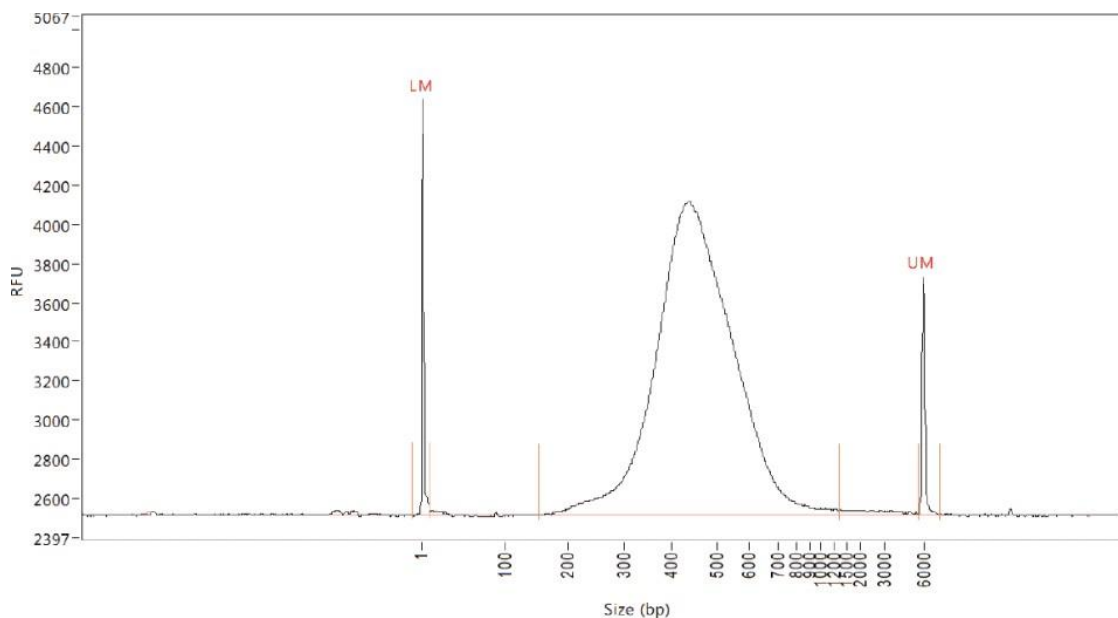
4.2.9. Quantificação de bibliotecas individuais e controlo de qualidade

MATERIAIS

- Equipamento e reagentes de quantificação fluorométrica
- Sistema de eletroforese capilar
- Água isenta de nuclease
- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sem RNase/DNase

PROCEDIMENTO

1. Prepare uma diluição de 4 vezes de cada biblioteca com água isenta de nuclease (por exemplo, 2 μ l de biblioteca em 6 μ l de água isenta de nuclease).
2. Quantifique as bibliotecas com um método fluorométrico (por exemplo, quantificação Qubit HS utilizando 2 μ l da diluição 4x da biblioteca mencionada acima).
3. Controle a qualidade das bibliotecas através da análise do seu perfil por eletroforese capilar. Os fragmentos de ADN da biblioteca devem ter uma distribuição de tamanho entre 300 pb e 700 pb.



Exemplo de uma distribuição da biblioteca de ADN obtida com o sistema de eletroforese capilar Agilent Fragment Analyzer. UM - Marcador superior, LM - Marcador inferior



4.3. Captura

4.3.1. Agrupamento de bibliotecas

MATERIAIS

- Bibliotecas individuais
- Human Cot DNA
- Universal Blockers - TS Mix
- Tubos de 1,5 ml de baixa adsorção de ADN

PROCEDIMENTO

1. Prepare uma pré-mistura dos seguintes elementos num tubo de baixa adsorção de ADN:

NÚMERO DE CAPTURAS (Consulte o tabela do ponto 3)	1	2	3	4
Human Cot DNA (em μl)	5	11	16,5	22
Universal Blockers - TS Mix (em μl)	2	4,4	6,6	8,8

2. Se efetuar duas ou mais capturas, pipete 7 μl da pré-mistura acima referida para tubos individuais de baixa adsorção de ADN.
3. Aos tubos individuais que contêm a pré-mistura acima referida, adicione um conjunto de bibliotecas individuais de acordo com o formato do kit:

FORMATO DO KIT	kit de 16 amostras	kit de 32 amostras	kit de 48 amostras	kit de 96 amostras
Número de bibliotecas individuais por captura	4	8	12	12
Quantidade de cada biblioteca por captura	300 ng	200 ng	150 ng	150 ng
Quantidade total de bibliotecas por captura	1200 ng	1600 ng	1800 ng	1800 ng

4. Misture bem, pipetando para cima e para baixo 10 vezes e centrifugue brevemente.
5. Seque cada mistura utilizando um concentrador de ADN a vácuo até a mistura estar completamente liofilizada. Utilize um aquecimento suave (45-50 °C) para acelerar a liofilização.



Sugestão: ponto de paragem seguro durante a noite a -20 °C.



4.3.2. Hibridação

MATERIAIS

- Bibliotecas liofilizadas
- 2x Hybridization Buffer
- Hybridization Buffer Enhancer
- Sondas Myeloid Solution
- Água isenta de nuclease
- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sem RNase/DNase
- Tubos de 1,5 ml
- 10x Wash Buffer I
- 10x Wash Buffer II
- 10x Wash Buffer III
- 10x Stringent Wash Buffer
- 2x Beads Wash Buffer

PREPARAÇÃO

1. Pré-aqueça o termociclador a 95 °C (ajuste a tampa para 99 °C).
2. Após os 10 minutos de desnaturação, mude diretamente para 65 °C (ajuste a tampa para 75 °C).



Importante: recomendamos a utilização de termocicladores diferentes para incubações a 95 °C e 65 °C, se disponíveis.

PROCEDIMENTO

1. Prepare uma Pré-mistura de hibridação de acordo com o número de reações de captura:

NÚMERO DE CAPTURAS	1	2	3	4
2x Hybridization Buffer (em µl)	8,5	18,7	28,05	37,4
Hybridization Buffer Enhancer (em µl)	3,4	7,48	11,22	14,96
Água isenta de nuclease (em µl)	1,1	2,42	3,63	4,84

2. Ressuspenda o sedimento liofilizado em 13 µl da pré-mistura de hibridação.
3. Transfira o sedimento ressuspenso para um tubo de PCR (um tubo por reação de captura).
4. Incube no termociclador a 95 °C durante 10 minutos.



Importante: não deixe que a temperatura do tubo desça abaixo dos 65 °C entre os passos 3 e 5, pois isso pode levar a uma hibridação incorreta da sonda.

5. Mova o tubo de PCR do termociclador de 95 °C para 65 °C e, em seguida, adicione 4 µl de sondas à mistura. Utilizando uma pipeta regulada para 13 µl, misture bem pipetando para cima e para baixo 5 vezes.
6. Incube no termociclador a 65 °C durante 4 horas.
7. Prepare antecipadamente as soluções de trabalho 1x dos diferentes tampões de lavagem, conforme descrito nas páginas seguintes, para permitir que atinjam o equilíbrio durante a reação de hibridação.



PREPARAÇÃO DO TAMPÃO DE LAVAGEM PARA 1 REAÇÃO

TAMPÃO	TAMPÃO CONCENTRADO (μl)	ÁGUA (μl)	VOLUME FINAL 1X (μl)
10x Wash Buffer I	33	297	330
10x Wash Buffer II	22	198	220
10x Wash Buffer III	22	198	220
10x Stringent Wash Buffer	44	396	440
2x Bead Wash Buffer	275	275	550



Importante: Pré-aqueça 1x Stringent Buffer e aliquote 110 μl de 1x Wash Buffer I a 65 °C num termobloco ou num banho de água durante pelo menos 2 horas. Mantenha o restante Wash Buffer I à temperatura ambiente.

PREPARAÇÃO DO TAMPÃO DE LAVAGEM PARA 2 REAÇÕES

TAMPÃO	TAMPÃO CONCENTRADO (μl)	ÁGUA (μl)	VOLUME FINAL 1X (μl)
10x Wash Buffer I	66	594	660
10x Wash Buffer II	44	396	440
10x Wash Buffer III	44	396	440
10x Stringent Wash Buffer	88	792	880
2x Bead Wash Buffer	550	550	1100



Importante: aqueça previamente 1x Stringent Buffer e aliquote 220 μl de 1x Wash Buffer I a 65 °C num termobloco ou num banho de água durante pelo menos 2 horas. Mantenha o restante Wash Buffer I à temperatura ambiente.

PREPARAÇÃO DO TAMPÃO DE LAVAGEM PARA 3 REAÇÕES

TAMPÃO	TAMPÃO CONCENTRADO (μl)	ÁGUA (μl)	VOLUME FINAL 1X (μl)
10x Wash Buffer I	99	891	990
10x Wash Buffer II	66	594	660
10x Wash Buffer III	66	594	660
10x Stringent Wash Buffer	132	1188	1320
2x Bead Wash Buffer	825	825	1650



Importante: aqueça previamente 1x Stringent Buffer e aliquote 330 μl de 1x Wash Buffer I a 65 °C num termobloco ou num banho de água durante pelo menos 2 horas. Mantenha o restante Wash Buffer I à temperatura ambiente.



PREPARAÇÃO DO TAMPÃO DE LAVAGEM PARA 4 REAÇÕES

TAMPÃO	TAMPÃO CONCENTRADO (μl)	ÁGUA (μl)	VOLUME FINAL 1X (μl)
10x Wash Buffer I	132	1188	1320
10x Wash Buffer II	88	792	880
10x Wash Buffer III	88	792	880
10x Stringent Wash Buffer	176	1584	1760
2x Bead Wash Buffer	1100	1100	2200



Importante: aqueça previamente 1x Stringent Buffer e aliquote 440 μl de 1x Wash Buffer I a 65 °C num termobloco ou num banho de água durante pelo menos 2 horas. Mantenha o restante Wash Buffer I à temperatura ambiente.

4.3.3. Preparação das esferas de estreptavidina

MATERIAIS

- Esferas de estreptavidina equilibradas à temperatura ambiente
- 1x Bead Wash Buffer
- Tubos de 1,5 ml
- Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sem RNase/DNase

PROCEDIMENTO

Efetue estes passos imediatamente antes do final da incubação de hibridação de 4 horas.

1. Misture as esferas, agitando-as no vórtex durante 15 segundos.
2. Transfira 100 μl de esferas por captura (200 μl para 2 reações, 300 μl para 3 reações, 400 μl para 4 reações) para um único tubo de 1,5 ml.
3. Coloque o tubo num suporte magnético e deixe-o repousar até a solução ficar transparente. Retire cuidadosamente e deite fora o sobrenadante.
4. Adicione 200 μl de 1x Bead Wash Buffer por captura (400 μl para 2 reações, 600 μl para 3 reações, 800 μl para 4 reações) ao tubo. Agite em vórtice durante 10 segundos.
5. Coloque o tubo num suporte magnético e deixe-o repousar até a solução ficar transparente. Retire cuidadosamente e deite fora o sobrenadante.
6. Repita os passos 4 e 5 uma vez.
7. Adicione 100 μl de 1x Bead Wash Buffer por captura (200 μl para 2 reações, 300 μl para 3 reações, 400 μl para 4 reações) ao tubo. Agite em vórtice durante 10 segundos.
8. Transfira 100 μl de esferas limpas para um novo tubo de PCR (um tubo por reação de captura).



- Coloque o(s) tubo(s) num suporte magnético em formato de placa de 96 poços e deixe-os repousar até a solução ficar transparente. Retire cuidadosamente e deite fora o sobrenadante.



Importante: não deixe secar as esferas.

Avance imediatamente para a Ligação dos alvos hibridizados às esferas.

4.3.4. Ligação dos alvos hibridizados às esferas

MATERIAIS

- Esferas de estreptavidina limpas em tubo(s) de PCR
- Reação(ões) de hibridação

PROCEDIMENTO



Importante: trabalhe rapidamente para garantir que a temperatura da amostra se mantém próxima dos 65 °C.

- Retire a(s) reação(ões) de hibridação do termociclador, centrifugue brevemente o(s) tubo(s) e volte a colocá-lo(s) no termociclador.
- Coloque os tubos de esferas de estreptavidina lavados no termociclador (não mais de dois tubos de cada vez para evitar a secagem das esferas).
- Para cada reação de hibridação, transfira 17 µl da solução da reação de hibridação para um tubo de PCR que contenha esferas limpas. Volte a suspender as esferas pipetando para cima e para baixo até a solução ficar homogênea.
- Ligue o ADN às esferas, colocando o(s) tubo(s) num termociclador regulado a 65 °C (tampa a 75 °C). Incubar durante 45 minutos.
- Durante a incubação, pipete suavemente para cima e para baixo o(s) tubo(s) de 15 em 15 minutos para garantir que as esferas permanecem em suspensão.

Avance diretamente para Lavar as esferas de estreptavidina para remover o ADN não ligado.

4.3.5. Lavar as esferas de estreptavidina para remover o ADN não ligado

MATERIAIS

- | | |
|---|--------------------------------------|
| • Alvos hibridizados em esferas | • 1x Wash Buffer II |
| • Tiras de 8 tubos de 0,2 ml sem RNase/DNase | • 1x Wash Buffer III |
| • Tubos de 1,5 ml de baixa adsorção de ADN | • 1x Stringent Wash Buffer (a 65 °C) |
| • 1x Wash Buffer I (1/3 a 65 °C e 2/3 à temperatura ambiente) | • Água isenta de nuclease |
| | • IDTE |



PROCEDIMENTO



Importante: certifique-se de que a temperatura se mantém próxima dos 65 °C nos passos 1 a 7.

Nota: se estiver a trabalhar com 2 ou mais tubos de captura, trabalhe de forma escalonada dos passos 2 ao passo 8, incluindo o seguinte:

1. Quando colocar o primeiro tubo no termobloco a 65 °C para a 1ª incubação de 5 min. (passo 5), inicie um temporizador.
2. Comece a processar o segundo tubo.
3. Ao colocar o segundo tubo a 65 °C, observe o tempo de separação entre os tubos e certifique-se de que respeita este intervalo de tempo ao longo dos passos 2 a 8, de modo a garantir que cada tubo incuba exatamente 5 minutos a 65 °C com a lavagem rigorosa.

1. Adicione 100 µl de 1x Wash Buffer I (a 65 °C) a cada um dos tubos de alvos hibridizados/esferas de estreptavidina.
2. Trabalhando com um tubo de cada vez, ressuspensa e transfira a mistura, uma a uma, para um novo tubo de 1,5 ml de baixa adsorção de ADN. Se estiver a trabalhar com dois ou mais tubos de captura, trabalhe de forma escalonada, como indicado acima.
3. Coloque o tubo num suporte magnético e deixe-o repousar até a solução ficar transparente. Retire cuidadosamente e deite fora o sobrenadante.
4. Adicione 200 µl de 1x Stringent Wash Buffer (a 65 °C) ao tubo.

Volte a suspender suavemente as esferas pipetando para cima e para baixo.

A forte mistura das esferas com o tampão de lavagem rigoroso pode diminuir a qualidade da captura.

5. Incube a 65 °C durante 5 minutos.
6. Coloque o tubo num suporte magnético e deixe-o repousar até a solução ficar transparente. Retire cuidadosamente e deite fora o sobrenadante.
7. Repita os passos 4 a 6 uma vez.

Trabalhe à temperatura ambiente.

8. Adicione 200 µl de 1x Wash Buffer I (à temperatura ambiente) ao seu tubo. Volte a suspender suavemente as esferas pipetando para cima e para baixo.

Nota: se estiver a trabalhar com 2 ou mais tubos de captura; a partir deste passo, processe todos os tubos ao mesmo tempo.

9. Agite em vórtice durante 2 minutos.
10. Coloque o(s) tubo(s) num suporte magnético e deixe-o(s) repousar até a solução ficar transparente. Retire cuidadosamente e deite fora o sobrenadante.
11. Adicione 200 µl de 1x Wash Buffer II a cada tubo(s). Agite em vórtice durante 1 minuto.



12. Coloque o(s) tubo(s) num suporte magnético e deixe-o(s) repousar até a solução ficar transparente. Retire cuidadosamente e deite fora o sobrenadante.
13. Adicione 200 μ l de 1x Wash Buffer III a cada tubo(s). Agite em vórtice durante 30 segundos. Centrifugue brevemente para recolher todo o líquido.
14. Coloque o(s) tubo(s) num suporte magnético e deixe-o(s) repousar até a solução ficar transparente. Retire cuidadosamente e deite fora o sobrenadante.
15. Adicione 200 μ l de 1x IDTE a cada tubo(s). Volte a suspender as esferas. Centrifugue brevemente para recolher todo o líquido.
16. Coloque o(s) tubo(s) num suporte magnético e deixe-o(s) repousar até a solução ficar transparente. Retire cuidadosamente e deite fora o sobrenadante.
17. Retire todo o líquido restante utilizando uma pipeta P10 ou P20.
18. Adicione 20 μ l de água isenta de nuclease a cada tubo(s), ressuspenda e transfira a mistura de esferas/água para um novo tubo de PCR.



4.3.6. Amplificação pós-captura

MATERIAIS

- Suspensão de pérolas de estreptavidina/água isenta de nuclease (20 µl)
- 2x KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix
- 10x Library Amplification Primer Mix
- Água isenta de nuclease

PREPARAÇÃO

Programa o termociclador para a Amplificação pós-captura utilizando as seguintes definições:

	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (SEGUNDOS)	
Tampa	99	-	15 ciclos
Etapa 1: Desnaturação inicial	98	45	
Etapa 2: desnaturação	98	15	
Etapa 3: hibridação	60	30	
Etapa 4: extensão	72	30	
Etapa 5: extensão final	72	60	
Manter	10	∞	

PROCEDIMENTO

1. Prepare a pré-mistura de PCR da seguinte forma:

PRÉ-MISTURA DE PCR				
Número de reação(ões)	1	2	3	4
2x KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix (em µl)	25	55	82,5	110
10x Library Amplification Primer Mix (em µl)	2,5	5,5	8,25	11
Água isenta de nuclease (em µl)	2,5	5,5	8,25	11

2. Adicione 30 µl de pré-mistura de PCR a cada suspensão de esferas. Misture bem, pipetando para cima e para baixo 10 vezes e centrifugue brevemente.
3. Coloque o(s) tubo(s) no termociclador e execute o programa Amplificação pós-captura.



Sugestão: ponto de paragem seguro durante a noite a 4 °C ou -20 °C para conservação mais prolongada.



4.3.7. Limpeza da amplificação pós-captura

MATERIAIS

- Produtos da reação por PCR em 50 µl cada
- Esferas AMPure® XP equilibradas à temperatura ambiente
- Etanol recém-preparado a 80%
- IDTE
- Tubos de baixa adsorção de ADN para conservação de bibliotecas

PROCEDIMENTO

1. Adicione 50 µl de esferas AMPure® XP a cada um dos 50 µl de produtos da reação por PCR. Misture bem, pipetando para cima e para baixo 10 vezes.
2. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos e centrifugue brevemente para recolher todo o líquido.
3. Coloque o(s) tubo(s) num suporte magnético durante 5 minutos ou até o líquido ficar transparente.
4. Elimine cuidadosamente 90 µl de sobrenadante utilizando uma pipeta multicanal.

Mantenha o(s) tubo(s) no suporte magnético para os passos seguintes.

5. Utilizando uma pipeta multicanal, adicione 170 µl de etanol a 80% às esferas. Deixe os tubos repousar durante 30 segundos a 1 minuto.
6. Elimine cuidadosamente o etanol.
7. Repita os passos 5 e 6 uma vez.
8. Retire o etanol residual com uma pipeta P10 ou P20.
9. Seque as esferas à temperatura ambiente durante 5 minutos. Não seque demasiado as pérolas, pois isso pode diminuir a quantidade de ADN recuperado.

Retire o(s) tubo(s) do suporte magnético.

10. Adicione 20 µl de IDTE às esferas. Misture bem, pipetando para cima e para baixo 10 vezes. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos e centrifugue brevemente para recolher todo o líquido.
11. Coloque o(s) tubo(s) num suporte magnético durante 5 minutos ou até o líquido ficar transparente.
12. Transfira cuidadosamente 18 µl do sobrenadante (recomenda-se transferir duas vezes 9 µl neste passo) para um tubo de armazenamento de bibliotecas novo e rotulado.



Sugestão: ponto de paragem seguro durante a noite a 4 °C ou -20 °C para conservação mais prolongada.



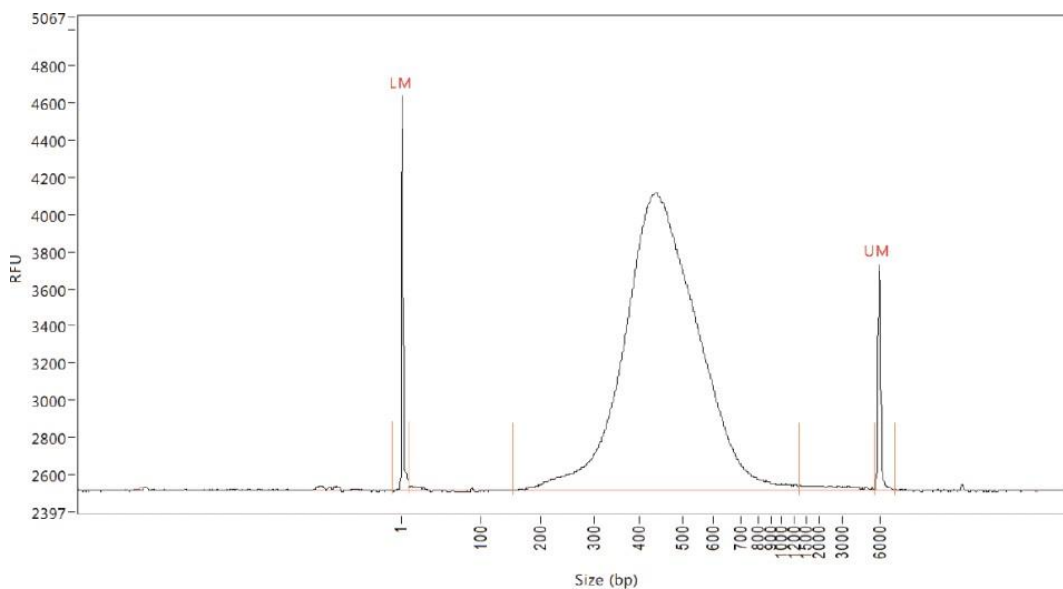
4.3.8. Quantificação final da biblioteca e controlo de qualidade

MATERIAIS

- Equipamento e reagentes de quantificação fluorométrica
- Sistema de eletroforese capilar

PROCEDIMENTO

1. Quantifique cada agrupamento de bibliotecas capturadas com um método fluorométrico (por exemplo, quantificação Qubit HS utilizando 2 µl da biblioteca).
2. Controle a qualidade do agrupamento de bibliotecas capturadas, analisando o seu perfil através de eletroforese capilar. Os fragmentos de ADN da biblioteca devem ter uma distribuição de tamanho entre 300 pb e 700 pb.



Exemplo de distribuição do tamanho do agrupamento de bibliotecas capturadas obtido com o sistema de eletroforese capilar Agilent Fragment Analyzer. UM - Marcador superior, LM - Marcador inferior



4.4. Sequenciação

4.4.1. Preparação da biblioteca para sequenciação

MATERIAIS

- Illumina MiSeq® Reagent Kit v3
- Bibliotecas finais capturadas
- EBT Buffer ou similar

PROCEDIMENTO

1. Determine a concentração molar de cada agrupamento com o tamanho médio da biblioteca (tamanho do pico em pares de bases) e a concentração (ng/μl) obtidos durante a etapa 5.3.8 da seguinte forma:

$$\text{Molaridade da biblioteca (nM)} = \frac{\text{Concentração da biblioteca (ng/uL)}}{\text{Tamanho médio em pares de base} \times 649.5} \times 10^6$$

2. Dilua cada agrupamento para 4 nM e misture-os em quantidades iguais (por exemplo, 5 μl de cada). Misture bem e utilize esta diluição de acordo com a recomendação de desnaturação padrão da Illumina®.
3. Carregue uma diluição de 10 pM das bibliotecas desnaturadas no MiSeq®.
4. O número mínimo de leituras recomendado é de 2,0 milhões de leituras por amostra, com um comprimento de leitura de 300 pb.

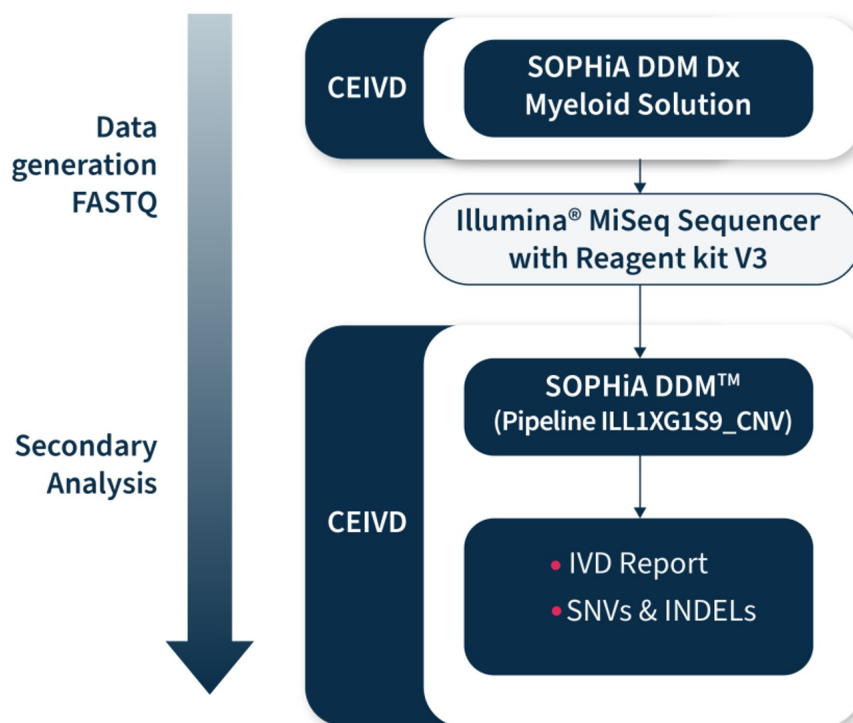


5. PROCEDIMENTO DE ANÁLISE

5.1. Instruções de instalação do Modo SOPHiA DDM™ Dx

Não é necessária qualquer instalação para utilizar o modo SOPHiA DDM™ Dx. Ser-lhe-á enviado um e-mail com instruções e uma ligação para o modo SOPHiA DDM™ Dx. Consulte o Manual do utilizador do modo SOPHiA DDM™ Dx para obter informações sobre gestão de contas, compatibilidades de navegadores e outros avisos importantes. Os documentos de apoio também estão disponíveis diretamente através do modo SOPHiA DDM™ Dx.

5.2. Descrição do fluxo de trabalho de análise para a geração de resultados de IVD



Descrição do fluxo de trabalho de análise para a SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution

Consulte o Manual do utilizador do modo SOPHiA DDM™ Dx para uma descrição completa do fluxo de trabalho de carregamento.



6. LIMITAÇÕES, ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

ADVERTÊNCIAS GERAIS

- Para obter instruções detalhadas sobre o software, consulte o manual do utilizador do modo SOPHiA DDM™ Dx.
- Se qualquer parte do manuseamento, protocolo, sequenciador, multiplexagem, etc. for alterada, as análises não são abrangidas pelas instruções de utilização descritas.
- Os dados fornecidos no Relatório de Qualidade (disponível para transferência a partir da Plataforma SOPHiA DDM™) são meramente informativos e não se destinam a ser utilizados para efeitos de diagnóstico.
- Não é possível garantir a exatidão dos resultados da análise. Os laboratórios de sequenciação têm de efetuar controlos de qualidade das amostras e assinalar as amostras não elegíveis. Amostras não elegíveis (por exemplo, amostra de biopsia insuficiente) podem levar ao comprometimento dos resultados. A SOPHiA GENETICS não se responsabiliza pelos resultados e consequentes decisões tomadas com base nesses resultados.
- Para um desempenho adequado do equipamento, são necessárias normas e procedimentos de boas práticas laboratoriais, para além do cumprimento rigoroso das instruções de utilização. Para obter informações de segurança específicas, consulte as fichas de dados de segurança de materiais (MSDS) correspondentes fornecidas com cada componente do equipamento.
- Devem ser definidas salas pré e pós-PCR separadas fisicamente para evitar a contaminação das amostras de ADN. Utilize sempre reagentes frescos, ADN corretamente extraído e conservado. Para mais informações sobre a qualidade e a integridade do ADN, consulte a Secção 5 das Instruções de utilização. Materiais e métodos do kit - Secção 5.2.1 Preparação de ADN genómico.
- Para realizar a experiência, deve utilizar pipetas corretamente calibradas e equipamento de laboratório adequado.
- Não deve misturar reagentes com números de lote diferentes.
- As decisões sobre os cuidados e o tratamento do doente devem basear-se no juízo médico independente do médico assistente, tendo em consideração todas as informações aplicáveis relativas ao estado do doente, tais como a história do doente e da família, os exames físicos, as informações de outros exames de diagnóstico e as preferências do doente, de acordo com a norma de cuidados numa determinada comunidade.

LIMITAÇÕES GERAIS

- A má qualidade dos dados devido a problemas na preparação da amostra ou na fase de sequenciação pode confundir a análise dos dados e gerar falsos positivos e/ou falsos negativos.
- A ausência de uma variante no relatório não exclui a presença de uma variação abaixo dos limites de deteção do ensaio.



PARA PROCEDIMENTOS DE DIAGNÓSTICO IN-VITRO

Variantes de nucleotídeos únicos [Single Nucleotide Variants (SNV)] / Inserções e deleções [Insertions and Deletions (INDEL)]

- A detecção de variantes neste equipamento foi otimizada para a detecção de SNV e INDEL curtos (até 2/3 do comprimento de leitura). Tenha em atenção que qualquer outro tipo de alteração pode ser ignorado pelo algoritmo.
 1. As fusões ou inversões de genes não podem ser detetadas.
 2. As deleções ou inserções com um ponto de rutura fora da região alvo podem não ser detetadas.
- A detecção de variantes neste equipamento foi otimizada nas regiões definidas como «regiões-alvo». Tenha em atenção que as regiões fora desta definição podem apresentar falsos negativos e/ou falsos positivos.
- Para um desempenho robusto do algoritmo, recomendamos uma cobertura de pelo menos 1000x para atingir a significância estatística em comparação com o ruído para a maioria das posições. Uma cobertura inferior aumentará significativamente o risco de identificação de variantes falsas negativas.
- As variantes podem ser omitidas ou incorretamente identificadas devido a limitações na conceção do kit.
- As variantes nas regiões para as quais o fragmento relevante do ADN não é extraído pelas sondas não podem ser detetadas pelo equipamento. As variantes de captura podem ser limitadas por:
 1. INDEL que afetam a hibridação das sondas. Isto pode levar a uma não detecção ou a uma estimativa incorreta da fração da variante.
 2. A presença de mutação(ões) adicional(ais) na região-alvo da sonda no mesmo alelo.
- As SNV ou INDEL em homopolímeros com um comprimento de dez pares de bases ou superior não podem ser identificadas com confiança, uma vez que a sua detecção é confundida por um elevado ruído de fundo.
- As deleções-inserções complexas podem ser registadas como variantes múltiplas se estiverem representadas no alinhamento como variantes múltiplas mais pequenas separadas por mais de 2 nucleótidos.
- As SNV ou INDEL em regiões de repetição longa ou de baixa complexidade especificadas nas regiões assinaladas no Anexo 4 também podem não ser detetadas.
- As regiões assinaladas no Anexo 4 apresentam características que tornam a detecção de variantes pouco fiável. Estas são comunicadas com avisos na interface do SOPHiA DDM™, e as variantes detetadas nestas regiões são comunicadas com uma bandeira.
- As regiões com elevada homologia de sequências podem causar incertezas no mapeamento e o risco de omissão ou de identificação de variantes erradas.
- As variantes podem ser representadas de diferentes formas numa determinada região. Se uma parte das leituras reportar a variante de uma forma diferente ou não captar a variante, a fração da variante pode ser subestimada ou a variante pode não ser detetada devido a uma fração baixa da variante.
- No caso de múltiplas inserções/duplicações presentes na mesma região, nem todas podem ser reportadas corretamente. Em especial, quando uma inserção mais pequena está completamente contida numa inserção



maior, pode não haver leituras que identifiquem exclusivamente a inserção mais pequena e esta pode não ser detetada, sendo apenas registada a inserção maior.

- No caso de múltiplas inserções/duplicações presentes na mesma região, nem todas podem ser quantificadas corretamente. Em especial, quando uma inserção mais pequena está completamente contida numa inserção maior, pode não haver leituras que identifiquem exclusivamente a inserção mais pequena e a fração de variantes comunicada para a inserção mais pequena pode estar subestimada e a fração de variantes da inserção maior sobrestimada.
- A interferência entre amostras devido à troca de índices pode ser agravada pelos seguintes fatores:
 1. Cobertura muito elevada em uma ou poucas amostras devido a problemas durante a quantificação/normalização da amostra ou amplificações de genes de alto nível
 2. Sobrecarga da célula de fluxo, ou seja, elevada densidade de aglomerados
 3. Diferenças na taxa de conversão das bibliotecas
- A interferência entre amostras na presença de contaminação de índice de baixo nível (<1%) pode ser agravada pelos seguintes fatores:
 1. Cobertura muito elevada em uma ou poucas amostras devido a problemas durante a quantificação/normalização da amostra ou amplificações de genes de alto nível
 2. Sobrecarga da célula de fluxo, ou seja, elevada densidade de aglomerados
 3. Diferenças na taxa de conversão das bibliotecas
- Recomenda-se que o utilizador tenha cuidado ao interpretar as variantes comunicadas abaixo de 2,5% e, possivelmente, utilize métodos de teste alternativos para confirmação.
- Qualquer problema durante o processamento da sequenciação de nova geração (SNG) ou problemas com a degradação da amostra podem causar uma baixa relação sinal-ruído e afetar negativamente a identificação de variantes.
- As alterações comunicadas podem incluir alterações somáticas (não hereditárias) ou da linha germinativa (hereditárias); no entanto, o teste não distingue entre alterações da linha germinativa e somáticas. O teste não fornece informações sobre a suscetibilidade.



7. AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO NÃO CLÍNICO

7.1. MÉTODOS

Geral

Neste estudo, o desempenho do kit SOPHiA DDM™ Dx MYS e do pipeline SOPHiA DDM™ Dx ILL1XG1S9_CNV foi avaliado com dados gerados num instrumento Illumina MiSeq® utilizando o ensaio SOPHiA DDM™ Dx MYS. A filtragem das variantes foi efetuada de acordo com o ruído de fundo medido nas amostras de diluição da linha germinativa e as presentes reivindicações dizem respeito a variantes acima do limite de deteção determinado pelas nossas experiências.

Os homopolímeros de 10 pb ou mais foram excluídos, assim como as regiões cobertas por menos de 1000 leituras. Para cada amostra, as variantes detetadas pelo pipeline foram comparadas com as variantes confirmadas "padrão de ouro" fornecidas por cada centro de sequenciação. Quaisquer variantes detetadas fora das regiões-alvo não foram consideradas (ver Anexo 4 para a lista completa das regiões-alvo e das regiões assinaladas). Uma região, o exão 15 de JAK2 com 25 pb, apresentou uma cobertura consistentemente inferior, pelo que foi excluída das nossas análises.

Definições de sensibilidade, especificidade, exatidão, precisão, repetibilidade e reprodutibilidade

Cada posição que foi analisada tanto pelo método de referência como pelo método que combina a utilização do instrumento MiSeq® e do painel SOPHiA DDM™ Dx MYS foi tida em consideração para calcular os parâmetros de desempenho analítico, tais como a sensibilidade, a especificidade, a exatidão, a precisão e a consistência.

Para todas as posições cobertas pelo painel SOPHiA DDM™ Dx MYS e para as quais existia informação de referência disponível, foram determinados os números das seguintes categorias: Os Verdadeiros Positivos [True Positives (TP)] e os Verdadeiros Negativos [True Negatives (TN)] estão presentes em ambos os conjuntos, os Falsos Positivos [False Positives (FP)] estão presentes apenas nas variantes detetadas pelo SOPHiA DDM™ Dx e os Falsos Negativos [False Negatives (FN)] estão presentes apenas na tabela de variantes confirmadas. Todas as posições rastreadas (TP+FP+TN+FN) foram determinadas subtraindo posições indeterminadas da região-alvo do painel SOPHiA DDM™ Dx MYS, que é CDS ± 25bp dos genes e exões especificados na documentação do SOPHiA DDM™ Dx MYS:

- Regiões indefinidas: regiões que contêm variantes de baixa confiança ou variantes confirmadas abaixo do limiar de notificação e, para efeitos de reprodutibilidade e repetibilidade, regiões com uma profundidade inferior a 1000x (para avaliar a reprodutibilidade e a repetibilidade da cobertura)
- O exão 15 de JAK2, que foi identificado como uma região onde a cobertura é difícil
- Regiões conhecidas com artefactos (regiões assinaladas)
- Regiões onde não existiam dados de referência ou onde estes eram ambíguos (ver também 5.1.3). Por exemplo, a sequenciação de Sanger não pode registar grandes INDEL no FLT3, pelo que estas variantes foram excluídas.

Além disso, as INDEL localizadas em regiões homopoliméricas de pelo menos 10 pb foram excluídas dos cálculos.

Todos os parâmetros foram calculados com as seguintes fórmulas:

1. A **sensibilidade** foi determinada como a percentagem de variantes confirmadas detetadas:



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

2. A **especificidade** foi determinada como a percentagem de posições negativas que foram corretamente identificadas como negativas:

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

(com TN= todas as posições rastreadas-TP-FP-FN)

3. A **exatidão** foi determinada como a percentagem de identificações corretas (positivas e negativas):

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

4. A **precisão** foi determinada como a percentagem de identificações positivas corretas de todas as identificações positivas:

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

5. A **repetibilidade da sequenciação** foi determinada, para cada par de réplicas intra-série A e B, como a percentagem de bases bem definidas (SP) em ambas as amostras entre as bases que estavam bem definidas em pelo menos uma amostra. As bases são consideradas bem definidas se estiverem suficientemente cobertas e não contiverem identificações de variantes de baixa confiança.

$$\text{Sequencing Repeatability} = \frac{\sum_{i \in [SP_A \cap SP_B]} 1}{\sum_{i \in [SP_A \cup SP_B]} 1}$$

6. A **repetibilidade da variante** - todas as posições que foram bem definidas em ambas as réplicas são tidas em conta para calcular a fração de bases que são idênticas em ambas as réplicas. Dadas as réplicas intra-série A e B com posições bem definidas SPA e SPB, SPA[i] e SPB[i] são o estado da variante na posição i., dx sendo o operador que devolve 1 quando x=0 e 0 quando x!=0, a Repetibilidade da Variante é definida da seguinte forma:

$$\text{Variant Repeatability} = \frac{\sum_{i \in [SP_A \cap SP_B]} \delta_{SPA[i]-SPB[i]}}{\sum_{i \in [SP_A \cap SP_B]} 1}$$

7. A **repetibilidade** foi definida como o produto das duas medições acima referidas:

$$\text{Repeatability} = \text{Variant Repeatability} \times \text{Sequencing Repeatability} \times 100$$

8. A **reprodutibilidade** foi definida de forma equivalente à Repetibilidade [ver fórmulas (5)-(7)] para as réplicas A e B entre séries.

TP, FP, TN e FN foram calculados através da soma de todas as amostras de cada série. A sensibilidade, a especificidade, a exatidão e a precisão foram calculadas com base nessas contagens totais, de acordo com as fórmulas acima indicadas. A especificidade, a exatidão e a precisão só foram calculadas utilizando amostras totalmente caracterizadas devido à ausência de posições de Verdadeiro Negativo nas amostras parcialmente caracterizadas. A repetibilidade e a reprodutibilidade foram calculadas utilizando todas as posições para todas as amostras e todas as séries consideradas.

Para determinar os intervalos de confiança em caso de sensibilidade de 100% ou de outras medidas, foram utilizados os métodos descritos por Mattocks et al (2010) (Mattocks CJ et al, EuroGentest Validation Group, 2010). Nos casos em que o



critério medido era inferior a 100%, foi utilizado o método exato (Clopper, et al 1934) para obter o intervalo de confiança sobre a probabilidade binomial para a sensibilidade, especificidade, exatidão e precisão (Clopper C et al, Biometrika, 1934). Para refletir a verdadeira diversidade das variantes, apenas foram utilizados TP, FP, FN e TN únicos nos cálculos dos intervalos de confiança.

7.2. DADOS

As amostras disponíveis são agrupadas em duas categorias, consoante a caracterização de elevada confiança disponível para todas as comparações de referência. Em primeiro lugar, as amostras parcialmente caracterizadas em que foram identificadas variantes conhecidas de elevada confiança foram processadas pela SOPHiA GENETICS (Centro A) ou por parceiros externos (Centros B a E) utilizando as condições experimentais recomendadas.

Estes resultados contêm uma grande variedade de casos clínicos representativos e permitem estimar a sensibilidade para a identificação de variantes. Além disso, foram incluídas réplicas para estimar a repetibilidade e a reprodutibilidade. A segunda categoria de amostras consiste em amostras de referência com regiões de elevada confiança fornecidas pelo fornecedor, ou variantes de elevada confiança do Genome in a bottle (GIAB), e amostras clínicas em que grandes porções das regiões-alvo do SOPHiA DDM™ Dx MYS foram analisadas por sequenciação de Sanger ou outros métodos de elevada precisão (tendo em conta os limites de deteção dos respetivos métodos). Este conjunto de amostras bem caracterizadas permite a determinação da especificidade, da precisão e da exatidão, bem como da sensibilidade. Os dados de entrada provêm de várias séries com vários doentes (um ficheiro de sequência por doente) executadas por quatro centros de sequenciação distintos: Centro A-E. Todos os ficheiros de uma série foram analisados em conjunto como parte do mesmo processo em lote.

7.3. CONCLUSÕES GERAIS

A tabela seguinte compila os resumos completos das variantes detetadas em comparação com a lista de variantes confirmadas (TP/FN) para cada série que contém amostras parcialmente caracterizadas.

Tabela 2. Resumos de variantes para cada série de amostras parcialmente caracterizadas

Série	N.º de amostras	Verdadeiros Positivos (TP)	Falsos Negativos (FN)
CentroA_Série01	1	15	0
CentroA_Série02	15	36	0
CentroA_Série03	16	37	0
CentroA_Série04	1	2	0
CentroA_Série06	1	15	0
CentroA_Série07	21	31	0
CentroA_Série08	20	142	0
CentroA_Série09	20	142	0
CentroA_Série10	24	599	0
CentroA_Série11	10	15	0
CentroA_Série14	8	8	0



Série	N.º de amostras	Verdadeiros Positivos (TP)	Falsos Negativos (FN)
CentroA_Série15	14	14	0
CentroB_Série01	22	78	0
CentroB_Série02	18	55	1
CentroC_Série01	11	57	0
CentroC_Série02	10	40	0
CentroD_Série01	10	15	0
CentroE_Série01	15	31	0
Total	237	1332	1

A tabela seguinte compila os resumos completos das variantes detetadas em comparação com a lista de variantes confirmadas (TP/FN/FP) e as posições de base sem variantes (TN) para cada série de amostras totalmente caracterizadas.

Tabela 3. Resumos de variantes para cada série de amostras totalmente caracterizadas

Série	N.º de amostras	Verdadeiros Positivos (TP)	Falsos Negativos (FN)	Falsos Positivos (FP)	Verdadeiros Negativos (TN)
CentroA_Série08	18	132	0	0	469693
CentroA_Série09	18	132	0	0	469231
Outros	11	152	0	2	480194
Total	47	416	0	2	1419118

A tabela seguinte apresenta as posições de base e as variantes de Verdadeiro Negativo (TN) único detetadas neste estudo de avaliação do desempenho. O número total de posições de base nas regiões analisadas foi de 48093 bases. No estudo, foram detetadas duzentos e dezanove (219) variantes únicas confirmadas. Verdadeiros Negativos únicos em que estavam disponíveis dados de referência de elevada confiança e abrangiam um total de 48092 pb, que cobrem 99% das regiões-alvo menos o exão JAK2 excluído (48547 pb).

Tabela 4. Resumos de variantes em todas as séries

Verdadeiros Positivos (TP)	219
Falsos Positivos (FP)	2
Falsos Negativos (FN)	1
Verdadeiros Negativos (TN)	48092



7.4. RESULTADOS

A combinação do instrumento Illumina MiSeq® ou HiSeq™, do ensaio SOPHiA DDM™ Dx MYS e do SOPHiA DDM™ Dx conduz a um desempenho observado de 99,92% em termos de sensibilidade, 99,99% em termos de especificidade, 99,99% em termos de exatidão, 99,52% em termos de precisão, 98,69% em termos de repetibilidade e 99,30% em termos de reprodutibilidade.

Tabela 5. Resumo do desempenho

N.º	Medição do desempenho	Média	5.º percentil
A	Taxa de cumprimento do objetivo	87,41%	[59,59%]
B	Uniformidade	99,88%	[99,40%]
C	Limite de deteção	2,5%* (observado)	[1%]

N.º	Medição do desempenho	Observado	[IC inferior a 95%]**
1	Sensibilidade	99,92%	[97,49%]
2	Especificidade	99,99%	[99,98%]
3	Exatidão	99,99%	[99,98%]
4	Precisão	99,52%	[91,47%]

N.º	Medição do desempenho	Observado	[IC inferior a 95%]***
5	Repetibilidade	98,69%	[98,66%]
6	Reprodutibilidade	99,30%	[99,27%]

* Para SNV e INDEL; com exceção da duplicação em tandem interna (ITD) de FLT3.

** Os IC de 95% foram calculados sobre as variantes únicas no estudo de avaliação do desempenho, a fim de refletir a diversidade real das variantes.

*** Os IC de 95% foram calculados em todas as posições para todas as amostras. A repetibilidade e a reprodutibilidade baseiam-se nas comparações descritas em Equivalência da Seleção de tamanho duplo (Dual Size Selection) e Reprodutibilidade entre centros.



8. SÍMBOLOS

Símbolo	Título
	Consulte as instruções de utilização
	Número de catálogo
	Código do lote (número de lote)
	Cuidado
	Fabricante
	Limite de temperatura
	Data-limite de utilização
	Conformidade europeia
	Representante autorizado na Comunidade Europeia
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Contém o suficiente para <n> testes
	Importador
	Data de fabrico
	Consulte a secção Advertências e precauções na "Secção 5. Materiais e métodos do kit"
	Consulte a secção Advertências e precauções na "Secção 5. Materiais e métodos do kit"



9. SUPORTE

Em caso de dificuldade na utilização do modo SOPHiA DDM™ Dx, consulte a secção de resolução de problemas do Manual do utilizador do modo SOPHiA DDM™ Dx disponível no modo SOPHiA DDM™ Dx ou contacte a nossa linha de apoio através do telefone +41 21 694 10 60 ou do endereço de correio eletrónico support@sophiagenetics.com. Visite www.sophiagenetics.com para mais informações. O Serviço de Apoio também pode ser contactado através de um pedido na Web a partir do ecrã «Dashboard» na secção «Support» do modo SOPHiA DDM™ Dx.

ANEXO 1. PLACAS ADAPTADORAS DE ÍNDICE DUPLO

32 adaptadores de índice duplo compatíveis com Illumina® em formato de placa de 96 poços (7 µl cada)

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



48 adaptadores de índice duplo compatíveis com Illumina® em formato de placa de 96 poços (7 µl cada)

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

96 adaptadores de índice duplo compatíveis com Illumina® em formato de placa de 96 poços (7 µl cada)

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



i5	Sequências i5 para a folha de amostras
D501	TATAGCCT
D502	ATAGAGGC
D503	CCTATCCT
D504	GGCTCTGA
D505	AGGCGAAG
D506	TAATCTTA
D507	CAGGACGT
D508	GTACTGAC

i7	Sequências i7 para a folha de amostras
D701	ATTACTCG
D702	TCCGGAGA
D703	CGCTCATT
D704	GAGATTCC
D705	ATTCAGAA
D706	GAATTCGT
D707	CTGAAGCT
D708	TAATGCGC
D709	CGGCTATG
D710	TCCGCGAA
D711	TCTCGCGC
D712	AGCGATAG

ANEXO 2. EQUIPAMENTO DE LABORATÓRIO UTILIZADO NO LABORATÓRIO DA SOPHIA GENETICS

MATERIAIS FORNECIDOS PELO UTILIZADOR	FORNECEDOR	NOME DO PRODUTO	N.º de CATÁLOGO
Tiras de 8 tubos sem RNase/DNase (0,2 ml)	Thermo Fisher Scientific	EasyStrip Snap Tubes	AB-2000
Tubos de baixa adsorção de ADN (1,5 ml)	Axygen	MaxyClear Microcentrifuges Tubes	MCT-175-C
Tubos (1,5 ml)	Eppendorf	Eppendorf Tubes	3810X
Tubos cónicos (15 ml e 50 ml)	Falcon	15 ml & 50 ml Conical Centrifuge Tubes	352096 & 352070
Pontas de filtro	Starlab	TipOne RPT	S1180-3710, S1183- 1740, S1180-8710, S1180-9710, S1182- 1730
Etanol (grau de biologia molecular)	Merck	Ethanol Absolute	1.00983.1000

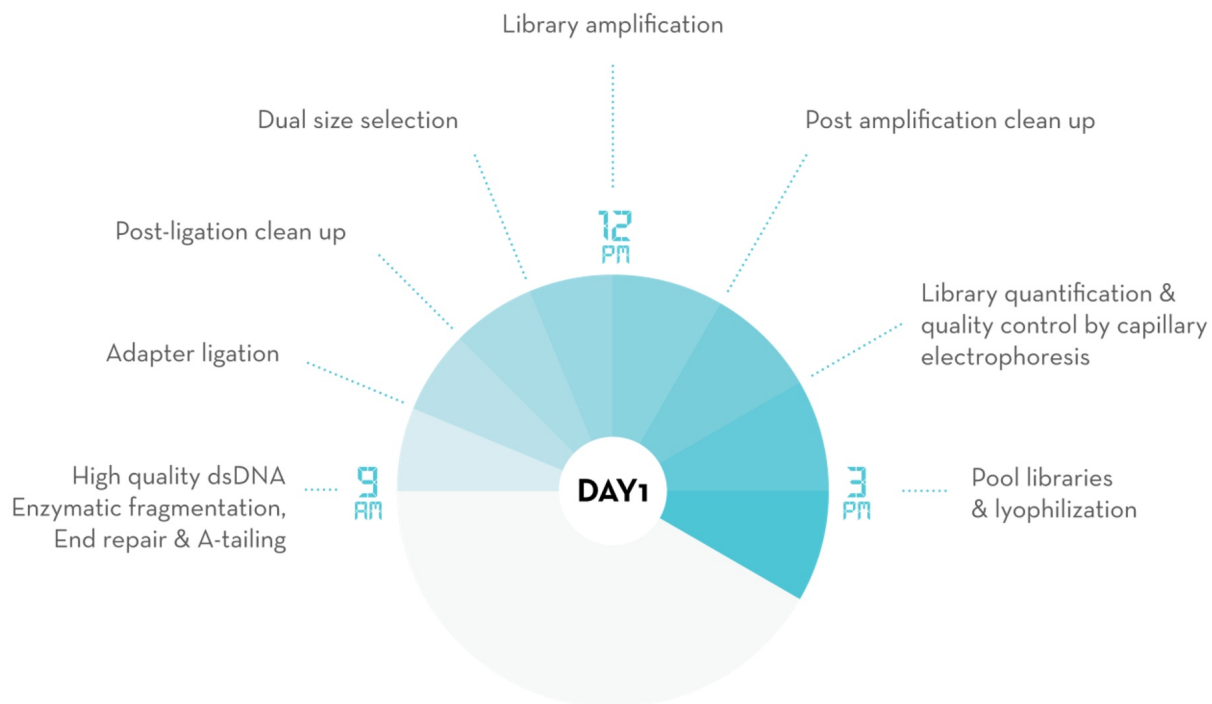
ZONA PRÉ-PCR	FORNECEDOR	NOME DO PRODUTO	N.º de CATÁLOGO
Aagitador tipo Vortex	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Microcentrífuga de mesa (compatível com tiras de 8 tubos)	Starlab	Mini Centrifuge	N2631-0007
Suporte de separação magnético do tipo 96 poços	Alpaqua	96S Super Magnet Plate	A001322
Suporte de separação magnético do tipo 96 poços	Thermo Fisher Scientific	DynaMag-96 Side Magnet	12331D
Pipetas multicanal (P10; P100; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108- 1100, S7108-3300
Termociclador com tampa aquecida programável	Biometra	TAdvanced 96	
Equipamento e reagente de quantificação fluorométrica	Thermo Fisher Scientific	Qubit 3.0 Fluorometer & Qubit dsDNA HS Assay kit	Q33216 & Q32854



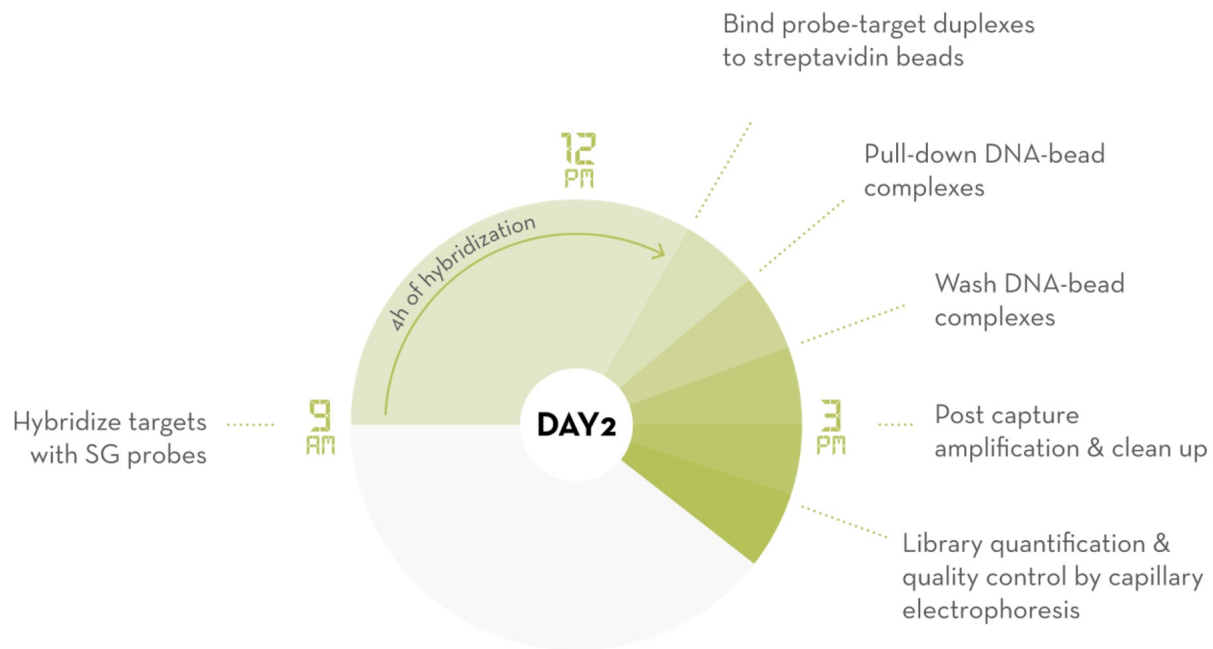
ZONA PRÉ-PCR	FORNECEDOR	NOME DO PRODUTO	N.º de CATÁLOGO
Pipetas de canal único (P10; P100; P200; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100- 1100, S7100-2200, S7100-1000

ZONA PÓS-PCR	FORNECEDOR	NOME DO PRODUTO	N.º de CATÁLOGO
Termociclador com tampa aquecida programável	Biometra	TAdvanced 96	
Sistema de eletroforese capilar	Advanced Analytical	Agilent Fragment Analyzer	
Concentrador de vácuo (SpeedVac™ ou similar)	Thermo Fisher Scientific	Savant DNA120-230	
Aquecedor de bloco seco ou banho de água (compatível com tubos de 1,5 ml)	Techne	Dri-Block DB-1	
Suporte de separação magnético (compatível com tubos de 1,5 ml)	Thermo Fisher Scientific	MagJET Separation Rack, 12 x 1.5 mL tube	MR02
Suporte de separação magnético (do tipo com 96 poços)	Alpaqua	96S Super Magnet Plate	A001322
Suporte de separação magnético do tipo 96 poços	Thermo Fisher Scientific	DynaMag-96 Side Magnet	12331D
Aagitador tipo Vortex	Grant instrument	Multi-tube Vortex Mixer, V32	
Aagitador tipo Vortex	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Microcentrífuga de mesa (compatível com tiras de 8 tubos)	StarLab	Mini Centrifuge	N2631-0007
Pipetas multicanal (P10; P100; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108- 1100, S7108-3300
Equipamento e reagente de quantificação fluorométrica	Thermo Fisher Scientific	Qubit 3.0 Fluorometer & Qubit dsDNA HS Assay kit	Q33216 & Q32854
Pipetas de canal único (P10; P100; P200; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100- 1100, S7100-2200, S7100-1000

ANEXO 3. FLUXO DE TRABALHO GERAL - SOLUÇÕES DE CAPTURA DO SOPHIA DDM™



Preparação da biblioteca
Com o SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I



CAPTURE

EASY WORKFLOW

- ONLY 1-4 TUBES TO HANDLE (MULTIPLEX POOLED LIBRARIES)
- ONLY 3 HOURS HANDS-ON TIME

ANEXO 4. LISTA DAS REGIÕES-ALVO E REGIÕES ASSINALADAS APLICÁVEIS

REGIÕES-ALVO*

CROMOSSOMA	INÍCIO	FIM
1	36931671	36931826
1	36931932	36932534
1	36932805	36932937
1	36933133	36933277
1	36933397	36933588
1	36933650	36933847
1	36934731	36934883
1	36935227	36935466
1	36937008	36937272
1	36937641	36937765
1	36937813	36938017
1	36938092	36938312
1	36939010	36939248
1	36939339	36939513
1	36940952	36941299
1	36945008	36945122
1	43814908	43815055
1	115256395	115256624
1	115258645	115258806
2	25457122	25457314
2	25458550	25458719
2	25459779	25459899
2	25461973	25462109
2	25463145	25463344
2	25463483	25463624
2	25464405	25464601
2	25466741	25466876



CROMOSSOMA	INÍCIO	FIM
2	25466998	25467232
2	25467383	25467546
2	25468096	25468226
2	25468863	25468958
2	25469003	25469203
2	25469463	25469670
2	25469894	25470052
2	25470434	25470643
2	25470880	25471146
2	25472500	25472618
2	25475037	25475091
2	25497784	25497981
2	25498343	25498437
2	25505231	25505605
2	25522982	25523137
2	25536756	25536878
2	198266440	198266637
2	198266683	198266879
2	198267254	198267575
2	198267647	198267784
2	198268283	198268513
2	198269774	198269926
2	198269973	198270221
2	209113067	209113409
4	55561652	55561972
4	55589724	55589889
4	55591997	55592241
4	55593358	55593515
4	55593556	55593733
4	55594151	55594312
4	55599210	55599383
4	55602638	55602800



CROMOSSOMA	INÍCIO	FIM
4	106155074	106158622
4	106162470	106162611
4	106163965	106164109
4	106164701	106164960
4	106180750	106180951
4	106182890	106183030
4	106190741	106190929
4	106193695	106194100
4	106196179	106197701
5	170834678	170834803
5	170837505	170837594
7	140453049	140453218
7	148504712	148504823
7	148506137	148506272
7	148506376	148506507
7	148507399	148507531
7	148508691	148508837
7	148511025	148511254
7	148511980	148512156
7	148512572	148512663
7	148513750	148513895
7	148514288	148514508
7	148514943	148515234
7	148516662	148516804
7	148523520	148523749
7	148524230	148524383
7	148525806	148525997
7	148526794	148526965
7	148529700	148529867
7	148543536	148543715
7	148544248	148544415
9	5021962	5022238



CROMOSSOMA	INÍCIO	FIM
9	5029757	5029931
9	5044377	5044545
9	5050660	5050856
9	5054537	5054909
9	5055643	5055813
9	5064857	5065065
9	5066652	5066814
9	5068996	5069233
9	5069899	5070077
9	5072466	5072651
9	5073672	5073810
9	5077427	5077605
9	5078280	5078469
9	5080203	5080405
9	5080507	5080708
9	5081699	5081886
9	5089648	5089888
9	5090420	5090595
9	5090713	5090936
9	5122978	5123146
9	5126307	5126471
9	5126658	5126816
9	133738124	133738447
9	133747490	133747625
9	133748221	133748449
9	133750229	133750464
9	133753776	133753979
9	133755429	133755569
11	533740	533969
11	534186	534347
11	32410578	32410750
11	32413492	32413635



CROMOSSOMA	INÍCIO	FIM
11	32414186	32414326
11	32417777	32417978
11	32421468	32421615
11	119148850	119149032
11	119149194	119149448
12	11803036	11803119
12	11905358	11905538
12	11992048	11992263
12	12006335	12006520
12	12022332	12022928
12	12037353	12037546
12	12038834	12038985
12	12043849	12044005
12	25380142	25380371
12	25398182	25398343
12	112888096	112888341
12	112910722	112910869
12	112915429	112915559
12	112915635	112915844
12	112919852	112920034
12	112924253	112924458
12	112926221	112926339
12	112926802	112927004
13	28592578	28592751
13	28607998	28608153
13	28608193	28608376
13	28608412	28608569
15	90631793	90632004
17	7572901	7573033
17	7573901	7574058
17	7576511	7576682
17	7576827	7576951



CROMOSSOMA	INÍCIO	FIM
17	7576993	7577180
17	7577473	7577633
17	7578151	7578314
17	7578345	7578579
17	7579286	7579615
17	7579674	7579746
17	7579813	7579937
17	74732855	74733267
18	42529820	42533330
19	13054501	13054752
19	33792218	33793345
20	31019360	31019507
20	31021061	31021745
20	31022209	31025166
21	36164406	36164932
21	36171572	36171784
21	36193939	36194018
21	36206681	36206923
21	36231745	36231900
21	36252828	36253035
21	36259114	36259434
21	36265196	36265285
21	36421113	36421221
21	44514739	44514923
21	44524399	44524537
X	15808593	15808684
X	15809031	15809161
X	15817969	15818101
X	15821785	15821944
X	15822208	15822345
X	15826330	15826419
X	15827297	15827466



CROMOSSOMA	INÍCIO	FIM
X	15833774	15834038
X	15836684	15836790
X	15838304	15838464
X	15840828	15841390

*Uma região-alvo é a posição em que o pipeline irá comunicar variantes de elevada confiança quando estas estiverem presentes. As coordenadas são baseadas em 1 e a coordenada final é incluída na região.

REGIÕES ASSINALADAS APLICÁVEIS**

CROMOSSOMA	INÍCIO	FIM	DESCRIÇÃO	GENE_EXÃO
1	36933564	36933584	As variantes nesta região com uma fração de variantes inferior a 10% podem ser confundidas por artefactos de sequenciação se for utilizada a química Illumina® V2	CSFR3_ ex14
17	7572977	7573010	As variantes nesta região com uma fração de variantes inferior a 10% podem ser confundidas por artefactos de sequenciação se for utilizada a química Illumina® V2	TP53_ ex11
18	42533111	42533125	As variantes nesta região com uma fração de variantes inferior a 10% podem ser confundidas por artefactos de sequenciação se for utilizada a química Illumina® V2	SETBP1_ ex04
21	36206686	36206787	As variantes nesta região com uma fração de variantes inferior a 10% podem ser confundidas por artefactos de sequenciação se for utilizada a química Illumina® V2	RUNX1_ ex07
2	198267762	198267783	As variantes nesta região com uma fração de variantes inferior a 10% podem ser confundidas por artefactos experimentais	SF3B1_ ex13
5	170837510	170837526	As variantes nesta região com uma fração de variantes inferior a 10% podem ser confundidas por artefactos experimentais	NPM1_ ex11
9	5126453	5126462	As variantes nesta região com uma fração de variantes inferior a 10% podem ser confundidas por artefactos de sequenciação se for utilizada a química Illumina® V2	JAK2_ ex24
11	119149355	119149373	As variantes nesta região com uma fração de variantes inferior a 10% podem ser confundidas	CBL_ ex09



CROMOSSOMA	INÍCIO	FIM	DESCRIÇÃO	GENE_EXÃO
			por artefactos de sequenciação se for utilizada a química Illumina® V2	
19	33792754	33792775	As variantes nesta região com uma fração de variantes inferior a 10% podem ser confundidas por artefactos de sequenciação se for utilizada a química Illumina® V2	CEBPA_ex01
19	33793007	33793041	As variantes nesta região com uma fração de variantes inferior a 10% podem ser confundidas por artefactos de sequenciação se for utilizada a química Illumina® V2	CEBPA_ex01
20	31022441	31022449	As variantes nesta região com uma fração de variantes inferior a 10% podem ser confundidas por artefactos de sequenciação se for utilizada a química Illumina® V2	ASXL1_ex12
7	148543693	148543705	As variantes nesta região com uma fração de variantes inferior a 10% podem ser confundidas por artefactos experimentais	EZH2_ex41
17	74733013	74733013	As variantes nesta região com uma fração de variantes inferior a 10% podem ser confundidas por artefactos experimentais	SRSF2_ex1
20	31022262	31022262	As variantes nesta região com uma fração de variantes inferior a 10% podem ser confundidas por artefactos experimentais que causam leituras quiméricas	ASXL1_ex12
18	42531410	42531410	As variantes nesta região com uma fração de variantes inferior a 10% podem ser confundidas por artefactos experimentais que causam leituras quiméricas	SETBP1_ex04
12	112919878	112920009	Esta região é altamente homóloga	PTPN11_ex10

**Uma região assinalada é uma determinada região que se sobrepõe a um exão e que pode causar alguma incerteza na identificação de variantes, por exemplo, baixa complexidade, ruído, pseudogene, etc. Poderá depender da tecnologia de sequenciação. Uma variante detetada nesta região não será classificada como de baixa confiança no SOPHiA DDM™ Dx, mas será associada a um triângulo de advertência e poderá encontrar uma mensagem de aviso detalhada no separador de advertências. A coluna de filtro da variante correspondente na tabela final de variantes completa não será marcada devido a esta região. As coordenadas são baseadas em 1 e a coordenada final é incluída na região.



Document Approvals
Approved Date: 29 Jan 2026

Approval Verdict: Approve	Coleman Spence, (cspence@sophiagenetics.com) Regulatory Approval 29-Jan-2026 16:00:04 GMT+0000
QA Approval Verdict: Approve	Claire Mullane, (cmullane@sophiagenetics.com) Quality Assurance Approval 29-Jan-2026 16:28:48 GMT+0000