

ISTRUZIONI PER L'USO

16, 32, 48 E 96 CAMPIONI

SOPHiA DDM™ Dx Solid Tumor Solution



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





SINTESI DELLE INFORMAZIONI

Nome prodotto	SOPHiA DDM™ Dx Solid Tumor Solution
Tipo di prodotto	Soluzione bundle
Famiglia di prodotti	Applicazione di diagnostica molecolare (kit + analisi)
ID algoritmo	ILL1XG1S8_FFPE_CNV
ID pannello geni	STS_v1
Versione del prodotto	1,0
Tipo di campione	DNA somatico isolato da campioni di tessuto tumorale fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE).
Sequenziatore	Illumina - MiSeq
Descrizione GMDN	Kit di reagenti per IVD / Software interpretativo di analisi genomica umana
ID documento	SG-00668
Versione del documento	V6.0
Data di revisione	Gennaio 2026

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



SOPHiA GENETICS SA
ZA La Pièce 12
1180 Rolle
Switzerland



BS0105ILLCSML03-016
BS0105ILLCSML03-032
BS0105ILLCSML03-048



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





CODICI DEI PRODOTTI

	CODICE PRODOTTO COMPLETO	BOX 1	BOX 2	KIT PREPARAZIONE LIBRERIA
REF	BS0105ILLCSML03-016	B1.01.0005.C-16	B2.0005.C-16	—
	BS0105ILLCSML03-032	B1.01.0005.C-32	B2.0005.C-32	
	BS0105ILLCSML03-048	B1.01.0005.C-48	B2.0005.C-32	



ESONERO DA RESPONSABILITÀ

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

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

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

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

MARCHI COMMERCIALI

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

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

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

KAPA™ è un marchio commerciale di Roche.

QIAseq® è un marchio registrato di Qiagen.

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



CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

ID DOCUMENTO/ VERSIONE	DATA	Versione equivalente delle istruzioni per l'uso in inglese	DESCRIZIONE DELLA MODIFICA
SG-00668 – v6.0	Gennaio 2026	SG-00660 – v8.0	- Modifica al sistema di numerazione delle versioni, nessuna versione aggiuntiva tra la versione 5.4 e la versione 6.0 - Aggiunta una nuova colonna nella tabella della cronologia delle revisioni per tenere traccia della versione inglese corrispondente; la colonna è vuota per tutte le revisioni precedenti - Sezione 4: Rimossa la sezione che descrive l'applicazione SOPHiA DDM Desktop. - Sezione 4: Correzione di un refuso con aggiornamento del testo a rilevamento di varianti nel gene correlato al tumore". - Avvertenze e Precauzioni: Aggiunta del numero CAS e della concentrazione per ciascuna sostanza pericolosa identificata. - Sezione 6: Rimossa la nota relativa alle funzionalità per uso esclusivo di ricerca (RUO). - Sezione 7: Rimosse le avvertenze e le limitazioni relative ai componenti fuori campo, inclusi: - grandi indel - rilevamento dell'amplificazione - stato MSI - Terminologia: "App Web SOPHiA DDM" sostituito con "Modalità SOPHiA DDM Dx" e riformulazioni minori correlate. - Sezione 5.1.1 Contenuto del kit - BOX 1: Riduzione del volume delle sonde di ibridazione SOPHiA GENETICS da 20 µl a 18 µl. - Sezioni 5.1.1, 5.3.1 e 5.3.2: Rimossa la proprietà intellettuale del fornitore di terze parti.
SG-00668– 5.4	Settembre 2025		Aggiornamento dell'indirizzo REP della CE
SG-00668 – 5.3	23 mag. 25		- Appendice 1: La tabella "16 adattatori a doppio indice compatibili con Illumina® in formato piastra a 96 pozzetti (7 µl ciascuno)" è stata rimossa dall'Appendice 1 a causa della discontinuità del formato della piastra con 16 adattatori a doppio indice. - Sezione 5.1.1 Contenuto del kit – BOX 1: Aggiornata per riflettere la modifica sopra indicata.
SG-00668 – 5.2	19 mar. 25		Sezione 5.1.1 Contenuto del kit - BOX 1: aumento del volume del tampone di ibridazione 2x da 50 µl a 75 µl; aumento del volume del Potenziatore per tamponi di ibridazione da 20 µl a 30 µl.
SG-00668 – 5.1	9 gen. 23		Correzione degli errori di formattazione.



ID DOCUMENTO/ VERSIONE	DATA	Versione equivalente delle istruzioni per l'uso in inglese	DESCRIZIONE DELLA MODIFICA
SG-00668 – 5.0	14 set 22		• Aggiunta del simbolo del marchio SOPHiA DDM™ e SOPHiA GENETICS. • Versione del documento aggiornata al numero intero successivo senza decimali.
SG-00668 – 4.5	19 apr. 22		• Sono state aggiunte istruzioni per l'applicazione web SOPHiA DDM™
SG-00160– 4.4	14 apr. 22		• Limitazioni e avvertenze: Modificato • Indirizzo dell'ufficio di SOPHiA GENETICS aggiornato • Modifiche Wet Lab come raccomandato globalmente • Piccole modifiche e correzioni di refusi
ID-60101-20 - 4.3	21 lug. 21		• Pagine 2, 32 - Modifiche estetiche • Pagina 19 - Ordine dei passaggi modificato. • Pagina 28 - Volume pre-mix PCR “da 48 campioni” corretto.
ID-60101-20 - 4.2	16 giu. 21		• Pagina 3 - Marchio commerciale modificato. • Pagina 47 - Piccola aggiunta nelle specifiche del file. Pagine 56, 57 - Refuso “Unico” nell'intestazione rimosso.
ID-60101-20 - 4.1	28 mag. 21		• Pagina 2 - Tabella delle informazioni riepilogative modificata. • Pagina 3 - Esonero da responsabilità modificato. • Pagine 11, 15, 16, 32 - Intestazione della tabella modificata. • Pagina 17 - Passaggi 1 e 2 della sequenza scambiati. • Pagina 19 - Preparazione dell'etanolo spostata in “Preparazione”. • Pagine 12, 20, 24, 25, 26, 27, 29, 38, 39, 40, 41, 46 - Modifiche estetiche e refusi. • Pagina 49 - Punti elenco 1, 2 e 16 aggiunti.
ID-60101-20 - 4.0	30 mar. 21		• Pagina del titolo, logo aziendale, intestazione, piè di pagina, ultima pagina. • Argomenti riorganizzati. • Inclusi installazione, caricamento e istruzioni sulla convenzione di denominazione dell'app web SOPHiA DDM™. • Combinate insieme quattro “Istruzioni per l'uso” in formato kit includendo numeri di campioni diversi. Incluse le tabelle e apportate le opportune modifiche, se e quando necessario. • Sono stati combinati i documenti “Istruzioni per l'uso” dei seguenti kit: - PM_CEIVD_B2.1.1.20_r2en - PM_CEIVD_B2.1.1.21_r2en - PM_CEIVD_B2.1.1.22_r2en - PM_CEIVD_B2.1.1.25_r1en • Piccole modifiche per chiarezza nelle sezioni seguenti: • Sezione 5.3.1 Pooling della libreria



ID DOCUMENTO/ VERSIONE	DATA	Versione equivalente delle istruzioni per l'uso in inglese	DESCRIZIONE DELLA MODIFICA
			Sezione 5.3.5 Lavare le sfere di streptavidina per rimuovere il DNA non legato



SOMMARIO

1. Uso/finalità previsti.....	10
2. Sintesi e spiegazione del test.....	11
3. Dichiarazione generale dei principi di prova / procedurali	12
4. Componenti del prodotto.....	13
5. Materiali e metodi del kit.....	14
5.1. Considerazioni iniziali	14
5.1.1. <i>Contenuto del kit (16, 32, 48 o 96 campioni)</i>	14
5.1.2. <i>Materiale richiesto (non fornito)</i>	17
5.2. Preparazione libreria	18
FFPE 5.2.1. <i>Preparazione del DNA</i>	18
5.2.2. <i>Preparazione dei pre-mix e dei reagenti</i>	21
5.2.3. <i>Frammentazione enzimatica</i>	23
5.2.4. <i>Riparazione finale e A-tailing</i>	24
5.2.5. <i>Legatura</i>	25
5.2.6. <i>Pulizia post-legatura</i>	26
5.2.7. <i>Amplificazione della libreria</i>	27
5.2.8. <i>Pulizia post-amplificazione</i>	28
5.2.9. <i>Quantificazione individuale della libreria e controllo qualità</i>	29
5.3. Cattura	31
5.3.1. <i>Pooling della libreria</i>	31
5.3.2. <i>Ibridazione</i>	32
5.3.3. <i>Preparazione delle sfere di streptavidina</i>	35
5.3.4. <i>Legame di target ibridati alle sfere</i>	35
5.3.5. <i>Lavare le sfere di streptavidina per rimuovere il DNA non legato</i>	37
5.3.6. <i>Amplificazione post-cattura</i>	39
5.3.7. <i>Pulizia post-cattura dell'amplificazione</i>	40
5.3.8. <i>Quantificazione finale della libreria e controllo qualità</i>	41
5.4. Sequenziamento	43
5.4.1. <i>Preparazione della libreria per il sequenziamento</i>	43
6. Procedura di analisi	44
6.1. Modalità SOPHiA DDM™ Dx Istruzioni per l'installazione.....	44
6.2. Descrizione del flusso di lavoro di analisi per la generazione di risultati IVD	44
7. Limitazioni, avvertenze e precauzioni	45
8. Valutazione della performance non cliniche	48
8.1. METODI	48
8.2. DATI	50
8.3. CONCLUSIONI GENERALI	50
8.4. RISULTATI	51



9. Simboli 53

10. Supporto 54

Appendice 1. Piastre adattatrici a doppio indice 55

Appendice 2. Attrezzatura di laboratorio usata nel laboratorio di SOPHiA GENETICS..... 58

Appendice 3. Flusso di lavoro generale – SOPHiA DDM™ Capture Solutions 60

Appendice 4. Elenco delle Regioni target e Regioni problematiche applicabili 62



1. USO/FINALITÀ PREVISTI

Il prodotto viene utilizzato per identificare le varianti che si verificano in 42 geni coinvolti nei tumori solidi puntando a specifiche posizioni soggette a mutazioni all'interno della sequenza genomica. Il prodotto è stato ideato come ausilio per gli operatori sanitari per prendere una decisione clinica relativa ai tumori solidi, e per fornire un razionale molecolare per una terapia appropriata.

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



2. SINTESI E SPIEGAZIONE DEL TEST

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

La seguente tabella mostra i geni bersagliati da SOPHiA DDM™ Dx Solid Tumor Solution (STS) (SOPHiA DDM™ Dx soluzione tumori solidi) e i tipi di tumore associati a questi geni.

Tabella 1. Geni bersaglio di SOPHiA DDM™ Dx Solid Tumor Solution (STS)

AKT1	FGFR3	MET
ALK	FOXL2	MYOD1
BRAF	GNA11	NRAS
CDK4	GNAQ	PDGFRA
CDKN2A	GNAS	PIK3CA
CTNNB1	H3F3A	PTPN11
DDR2	H3F3B	RAC1
DICER1	HIST1H3B	RAF1
EGFR	HRAS	RET
ERBB2	IDH1	ROS1
ERBB4	IDH2	SF3B1
FBXW7	KIT	SMAD4
FGFR1	KRAS	TERT
FGFR2	MAP2K1	TP53



3. DICHIARAZIONE GENERALE DEI PRINCIPI DI PROVA / PROCEDURALI

La funzione convalidata dell'analisi con SOPHiA DDM™ Dx Solid Tumor Solution (STS) (SOPHiA DDM™ Dx soluzione tumori solidi) consiste nell'analizzare i dati NGS grezzi generati da uno strumento Illumina® MiSeq® con il kit di reagenti MiSeq® Reagent Kit v3, su campioni somatici (FFPE) con KAPA™ Library Amplification Kit e KAPA™ HyperPlus Kit.

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

Per condurre l'analisi, i risultati devono essere caricati sulla piattaforma nella modalità SOPHiA DDM™ Dx e analizzati con l'applicazione SOPHiA DDM™ Dx STS.



4. COMPONENTI DEL PRODOTTO

SOPHiA DDM™ Dx STS è costituito da due componenti: il kit NGS e la pipeline bioinformatica utilizzata in combinazione con un accessorio IVD, la modalità SOPHiA DDM™ Dx basata su cloud.

- Lo scopo del kit NGS è preparare e arricchire librerie di DNA da campioni somatici (FFPE) adatti al sequenziamento su un sequenziatore Illumina® MiSeq®. Il kit NGS consente di generare dati di sequenziamento mirati. Gli elementi sono descritti nella seguente sezione 5. Materiali e metodi del kit – 5.1. Considerazioni iniziali - 5.1.1 Contenuto del kit.
- La pipeline bioinformatica (“pipeline STS”) processa i dati grezzi NGS mediante algoritmi in grado di rilevare le varianti nei geni correlati al tumore.
- La modalità SOPHiA DDM™ Dx è un’applicazione front-end basata sul web, disponibile come “software-as-a-service” (SaaS), utilizzata per generare un rapporto scaricabile per i geni menzionati nella Tabella 1 per SNV e INDEL. Si applicano limitazioni - si rimanda alla sezione 7 - Limitazioni, avvertenze e precauzioni.



5. MATERIALI E METODI DEL KIT

5.1. Considerazioni iniziali

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

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

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

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

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

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

- Universal Blockers - TS Mix (12 µl)
- Human Cot DNA (25 µl)
- Solid Tumor 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)
- A seconda del formato del kit: 32, 48 o 96 adattatori compatibili Illumina® a doppio indice in formato piastra da 96 pozzetti (7 µl ciascuno): vedere l'Appendice 1 per la visualizzazione e le sequenze degli adattatori.



BOX 2 (CONSERVARE TRA +2 °C E +8 °C)

- Dynabeads® M-270 Streptavidin (440 µl)
- Agencourt® AMPure® XP (3 x 1,5 ml per 16 campioni, 8,7 ml per 32 campioni e 11,6 ml per 48 campioni, vedere la nota per 96 campioni)
- IDTE Low TE Buffer (10 ml)
- Nuclease-free water (20 ml)

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

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

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Nome del prodotto	GHS		Parole di segnalazione	Componente pericoloso
	Pittogramma	Frase H e P		
2X Tampone di ibridazione		• H300 Letale se ingerito. • H311 Tossico per contatto con la pelle. • H315 Provoca irritazione cutanea. • H370 Provoca danni agli organi. • H370 Provoca danni agli organi (sistema nervoso centrale). • H411 Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. • P260 Non respirare i vapori/gli aerosol. • P264 Lavare accuratamente la pelle contaminata dopo la manipolazione. • P270 Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso. • P273 Non disperdere nell'ambiente. • P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. • P301+P310 In caso di ingestione: Chiamare immediatamente un centro antiveleni/un medico. • P302+P352 In caso di contatto con la pelle: Lavare con abbondante acqua. • P308+P311 In caso di esposizione o di possibile esposizione: Chiamare un centro antiveleni o un medico. • P321 Trattamento specifico (vedere il consiglio medico su questa etichetta). • P330 Sciacquare la bocca.	Pericolo	Cloruro di ammonio tetrametilico Concentrazione: 49% CAS: 75-57-0



GHS		Parole di segnalazione		
Nome del prodotto	Pittogramma	Frase H e P		Componente pericoloso
		- P332+P313 In caso di irritazione della pelle: Consultare un medico. - P362+P364 Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. - P391 Raccogliere il materiale fuoriuscito. - P405 Conservare sotto chiave. - P501 Smaltire il contenuto/contenitore in conformità alle normative nazionali.		
Potenziatore per tamponi di ibridazione		- H351 Sospettato di causare il cancro. - H360 Può nuocere alla fertilità o al nascituro. - H373 Può causare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta. - P201 Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso. - P202 Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze. - P260 Non respirare i vapori/gli aerosol. - P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. - P308+P313 In caso di esposizione o di possibile esposizione: Consultare un medico. - P314 In caso di malessere, consultare un medico. - P405 Conservare sotto chiave. - P501 Smaltire il contenuto/contenitore in conformità alle normative nazionali.	Pericolo	Formammide Concentrazione: 100% CAS: 75-12-7
10x tampone di lavaggio stringente		- H302 Nocivo se ingerito. - H315 Provoca irritazione cutanea. - H319 Provoca grave irritazione oculare.	Pericolo	Sale sodico dell'acido etilendiamminotetracetico Concentrazione: 2,5% CAS: 6381-92-6
10x tampone di lavaggio I		- H228 Solido infiammabile. - H302 Nocivo se ingerito. - H315 Provoca irritazione cutanea. - H318 Provoca gravi lesioni oculari. - H332 Nocivo se inalato. - H401 Tossico per gli organismi acquatici.	Pericolo	Dodecilsolfato sodico Concentrazione: 4,9% CAS: 151-21-3



Nome del prodotto	GHS Pittogramma	Frase H e P	Parole di segnalazione	Componente pericoloso
		• H402 Nocivo per gli organismi acquatici. • H412 Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. • P273 Non disperdere nell'ambiente. • P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. • P305+P351+P338 In caso di contatto con gli occhi: Sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. • P310 Chiamare immediatamente un centro antiveneni/un medico. • P501 Smaltire il contenuto/contenitore in conformità alle normative nazionali.		

Usare  e  come dispositivo di protezione individuale.

5.1.2. Materiale richiesto (non fornito)

MATERIALI FORNITI DALL'UTENTE (DA ACQUISTARE SEPARATAMENTE)

- Kit KAPA™ HyperPlus KK8512 per 24 reazioni (Roche N. No: 07962401001) o KK8514 per 96 reazioni (Roche N. Cat.: 07962428001) - raccomandato a causa del volume extra di reagente fornito in questo formato di kit
- Kit amplificazione libreria KAPA™ KK2620 (Roche N. No: 07958978001)
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml
- Provette a basso legame con il DNA da 1,5 ml
- Provette da 1,5 ml
- Provette coniche da 50 ml
- Punte filtro
- Etanolo (grado biologia molecolare)
- Reagenti per il sequenziamento Illumina®.



ATTREZZATURA DA LABORATORIO

Per evitare la contaminazione del campione:

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

5.2. Preparazione libreria

FFPE 5.2.1. Preparazione del DNA

MATERIALI

- DNA estratto da tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (DNA FFPE)
- KAPA™ Frag Conditioning Solution (KAPA™ Frag - soluzione di condizionamento)
- IDTE
- Acqua senza nucleasi
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml



IMPORTANTE

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

Raccomandiamo vivamente di utilizzare la quantità massima di DNA indicata nel protocollo per generare dati di sequenziamento di alta qualità.

A seconda della quantità di DNA utilizzata, regolare il numero di cicli di PCR secondo la seguente tabella:

TABELLA 1. CORRELAZIONE TRA GLI INPUT DI DNA E I CICLI DI PCR RICHIESTI (5.2.7 AMPLIFICAZIONE DELLA LIBRERIA)

Quantità di DNA FFPE (ng)	$10 \leq n < 50$	$50 \leq n < 100$	$100 \leq n < 200$
Cicli di PCR	12	10	8

Per evitare errori nell'input del DNA, si raccomanda una diluizione iniziale per ottenere una concentrazione compresa tra 50 e 100 ng/μl. La concentrazione del DNA dovrebbe essere confermata tramite quantificazione fluorometrica (ad es. Qubit®, Thermo Fisher) e il valore ottenuto dovrebbe essere usato per calcolare la diluizione finale.

PREPARAZIONE

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

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

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

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

PROCEDURA

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

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



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

DILUIZIONE DNA FFPE	
DNA FFPE	Quantità di DNA FFPE (cfr. tabella 1)
IDTE	Completare a 25 µl

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



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

3. Preparare la seguente diluizione per KAPA™ Frag Conditioning Solution (KAPA™ Frag soluzione di condizionamento):

KAPA™ FRAG CONDITIONING SOLUTION (KAPA™ FRAG - SOLUZIONE DI CONDIZIONAMENTO)							
Numero di reazioni	4	8	12	16	24	32	48
Soluzione di condizionamento Frag (in µl)	3,1	3,1	3,1	6,2	6,2	9,3	12,4
Acqua senza nucleasi (in µl)	196,9	196,9	196,9	393,8	393,8	590,7	787,6

4. Preparazione del DNA FFPE per la reazione di frammentazione:

- A seconda del numero di campioni, procedere come segue:
 - Se si stanno processando **4 campioni**, aggiungere 10 µl di soluzione di condizionamento KAPA™ Frag diluita a ciascuna provetta della striscia da 4 provette contenente 25 µl di campioni di DNA FFPE (un totale di 35 µl in ciascuna provetta della striscia da 4 provette).
 - Se si stanno processando **8 o più campioni**, procedere come segue:
 - Per facilitare il pipettaggio, creare una riserva di soluzione di condizionamento KAPA™ Frag aggiungendo i seguenti volumi a un nuovo set di strisce da 4 o 8 provette secondo il seguente schema:

NUMERO DI REAZIONI	8	12	16	24	32	48
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Soluzione di condizionamento KAPA™ Frag diluita (in µl)	30	45	30	45	50	75



- b. Utilizzando una pipetta multicanale, aggiungere 10 µl di soluzione di condizionamento KAPA™ Frag diluita dalle provette precedenti ai 25 µl di campioni di DNA FFPE (un totale di 35 µl in ciascuna provetta delle strisce da 4 o 8 provette).
- Usando una pipetta multicanale impostata su 20 µl, mescolare delicatamente pipettando su e giù 5 volte e centrifugare brevemente in una microcentrifuga.

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

5.2.2. Preparazione dei pre-mix e dei reagenti

COMPONENTI E REAGENTI

- Enzima KAPA™ Frag
- Tampone KAPA™ Frag 10x
- Tampone di legatura
- Tampone riparazione finale e A-tailing
- Mix enzimi riparazione finale e A-tailing
- DNA Ligase (DNA ligasi)
- KAPA™ HiFi HotStart Ready Mix 2x
- Primer Mix per amplificazione librerie 10x
- Acqua senza nucleasi
- Sfere AMPure® XP
- Etanolo

PREPARAZIONE

- Rimuovere i componenti del kit KAPA™ HyperPlus dalla conservazione a -20 °C e scongelarli sul ghiaccio.
- Rimuovere la piastra adattatrice a doppio indice dal luogo di conservazione a -20 °C e metterla in frigorifero a 4 °C per usarla successivamente.
- Rimuovere le sfere AMPure® XP dal luogo di conservazione a 2-8 °C e lasciarle acclimatare alla temperatura ambiente per almeno 30 minuti.
- Preparare l'etanolo fresco all'80% (volume secondo il seguente schema in base al numero di reazioni):

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

- Una volta scongelati i componenti del kit KAPA™ HyperPlus, mescolare i reagenti invertendo la provetta 5-10 volte e centrifugare brevemente in una microcentrifuga.

PRE-MIX



Importante: I volumi elencati nelle seguenti tabelle sono calcolati sulla base dei reagenti forniti in KAPA™ HyperPlus (24 reazioni). I volumi extra di reagenti forniti in KAPA™ HyperPlus (96 reazioni) consentono di preparare un volume aggiuntivo del 5% per ciascun mix elencato di seguito.

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



PRE-MIX DI FRAMMENTAZIONE							
Numero di reazioni	4	8	12	16	24	32	48
Tampone KAPA™ Frag 10x (in µl)	22	44	65	88	130	176	260
Enzima KAPA™ Frag (in µl)	44	88	130	176	260	352	520

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

2. Preparare il **Pre-mix riparazione finale e A-tailing (ER&AT)** come segue:

PRE-MIX RIPARAZIONE FINALE E A-TAILING (ER&AT)							
Numero di reazioni	4	8	12	16	24	32	48
Tampone ER&AT (in µl)	30,8	61,6	92,4	123,2	186,7	246,4	373,4
Enzima ER&AT (in µl)	13,2	26,4	39,6	52,8	80	105,6	160

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

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

PRE-MIX DI LEGATURA							
Numero di reazioni	4	8	12	16	24	32	48
Tampone di legatura (in µl)	132	264	396	528	810	1056	1620
DNA Ligase (DNA ligasi) (in µl)	44	88	132	176	270	352	540
Acqua senza nucleasi (in µl)	22	44	66	88	135	176	270

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



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

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



PRE-MIX PCR							
Numero di reazioni	4	8	12	16	24	32	48
KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix 2x (in µl)	110	220	330	440	675	880	1350
Primer Mix per amplificazione librerie 10x (in µl)	11	22	33	44	67,5	88	135
Acqua senza nucleasi (in µl)	11	22	33	44	67,5	88	135

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

5.2.3. Frammentazione enzimatica

MATERIALI

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

PREPARAZIONE

- Preriscaldare il termociclatore a 37 °C (impostare il coperchio a 45 °C).

PROCEDURA



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

1. A seconda del numero di campioni, procedere come segue:
 - Se si stanno processando **4 campioni**, procedere al passaggio 2.
 - Se si stanno processando **8 o più campioni**, per facilitare il pipettaggio, creare una riserva di pre-mix di 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
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Pre-mix Frag (in µl)	32	48	32	48	65	96



2. Assemblare la reazione come segue:

- Utilizzando una pipetta multicanale, se si stanno processando 8 o più campioni, aggiungere 15 µl di pre-mix frammentazione a ciascuno dei 35 µl di campioni di DNA FFPE (totale di 50 µl in strisce da 4 o 8 provette).
- Usando una pipetta impostata a 40 µl (multicanale se si stanno processando 8 o più campioni), mescolare accuratamente pipettando su e giù per 5 volte e centrifugare brevemente in una microcentrifuga.

3. Incubare nel termociclatore a 37 °C per 20 minuti.

Mettere sul ghiaccio immediatamente per arrestare la reazione di frammentazione.

Procedere immediatamente alla riparazione finale e all'A-tailing.

5.2.4. Riparazione finale e A-tailing

MATERIALI

- DNA FFPE frammentato in 50 µl
- Pre-mix di riparazione finale e A-tailing (ER&AT)

PREPARAZIONE

- Preriscaldare il termociclatore a 65 °C (impostare il coperchio a 75 °C).

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 pre-mix ER&AT aggiungendo i seguenti volumi a un nuovo set di strisce da 4 o 8 provette secondo il seguente schema:

NUMERO DI REAZIONI	8	12	16	24	32	48
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Pre-mix ER&AT (in µl)	21,5	32,5	21,5	32,5	43	65

2. Assemblare la reazione come segue:

- Utilizzando una pipetta multicanale, se si stanno processando 8 o più campioni, aggiungere 10 µl di pre-mix ER&AT a ciascuno dei 50 µl di campioni di DNA FFPE (totale di 60 µl in strisce da 4 o 8 provette).



- Usando una pipetta impostata a 40 μ l (multicanale se si stano processando 8 o più campioni), mescolare accuratamente pipettando su e giù per 5 volte e centrifugare brevemente in una microcentrifuga.
3. Incubare nel termociclatore a 65 °C per 30 minuti e mettere subito nel ghiaccio.

Procedere immediatamente alla legatura.

5.2.5. Legatura

MATERIALI

- Prodotti di reazione ER&AT in 60 μ l ciascuno
- Pre-mix di legatura
- Adattatori a doppio indice
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

PREPARAZIONE

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

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

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

PROCEDURA

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



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

2. Usando una pipetta multicanale, trasferire 60 μ l di ciascun prodotto di reazione ER&AT alle strisce da 4 o 8 provette contenenti 5 μ l di adattatori a doppio indice.
3. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
4. Usando una pipetta multicanale se si stanno processando 8 o più campioni, aggiungere 45 μ l di pre-mix di legatura a ciascun prodotto di reazione ER&AT (65 μ l in ciascuna provetta della striscia da 4 o 8 provette).
5. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
6. Incubare nel termociclatore a 20 °C per 15 minuti (coperchio aperto).



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

Procedere alla pulizia post legatura.

5.2.6. Pulizia post-legatura

MATERIALI

- Prodotti di reazione legati in 110 μ l ciascuno
- Sfere AMPure XP equilibrate a temperatura ambiente
- Etanolo appena preparato all'80%
- IDTE
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

PROCEDURA

1. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 88 μ l di sfere AMPure® XP ogni 110 μ l di prodotti di reazione di legatura. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte.
2. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
3. Posizionare le strisce da 4 o 8 provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
4. Eliminare accuratamente 170 μ l del surnatante usando una pipetta multicanale.

Tenere le provette sul rack magnetico per i passaggi successivi.

5. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 170 μ l di etanolo all'80% alle sfere. Incubare da 30 secondi a 1 minuto.



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

Rimuovere le provette dal rack magnetico.

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

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

Procedere all'amplificazione della libreria.

5.2.7. Amplificazione della libreria

MATERIALI

- Prodotti di reazione legati e sfere risospese in 20 μ l di IDTE ciascuno
- Pre-mix PCR

PREPARAZIONE

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

	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (IN SECONDI)	
Coperchio	99	-	
Passaggio 1: Denaturazione iniziale	98	45	
Passaggio 2: Denaturazione	98	15	
Passaggio 3: Annealing	60	30	n cicli*
Passaggio 4: Estensione	72	30	
Passaggio 5: Estensione finale	72	60	
Mantenere	10	∞	

* Seguire la tabella 1 (sezione 5.2.1 Preparazione del DNA FFPE) per determinare il numero di cicli PCR in base alla quantità di materiale di partenza.



PROCEDURA

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

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

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



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

5.2.8. Pulizia post-amplificazione

MATERIALI

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

PROCEDURA

1. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 50 μl di sfere AMPure XP ogni 50 μl di prodotto PCR. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte.
2. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.



3. Posizionare le strisce da 4 o 8 provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.

4. Eliminare accuratamente 90 μ l del surnatante usando una pipetta multicanale.

Tenere le provette sul rack magnetico per i passaggi successivi.

5. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 170 μ l di etanolo all'80% alle sfere.

Lasciare riposare da 30 secondi a 1 minuto.

6. Eliminare accuratamente l'etanolo usando una pipetta multicanale.

7. Ripetere i passaggi 5 e 6 una volta.

8. Rimuovere l'etanolo residuo usando una pipetta multicanale P10 o P20.

9. Asciugare all'aria le sfere a temperatura ambiente per 5 minuti. Non asciugare troppo le sfere perché questo potrebbe diminuire la quantità di DNA recuperato.

Rimuovere le provette dal rack magnetico.

10. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 20 μ l di acqua senza nucleasi alle sfere. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare per raccogliere tutto il liquido.

11. Posizionare le strisce da 4 o 8 provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.

12. Trasferire con attenzione 18 μ l di surnatante (si consiglia di trasferire due volte 9 μ l in questo passaggio) in una nuova provetta etichettata per la conservazione della libreria.



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

5.2.9. Quantificazione individuale della libreria e controllo qualità

MATERIALI

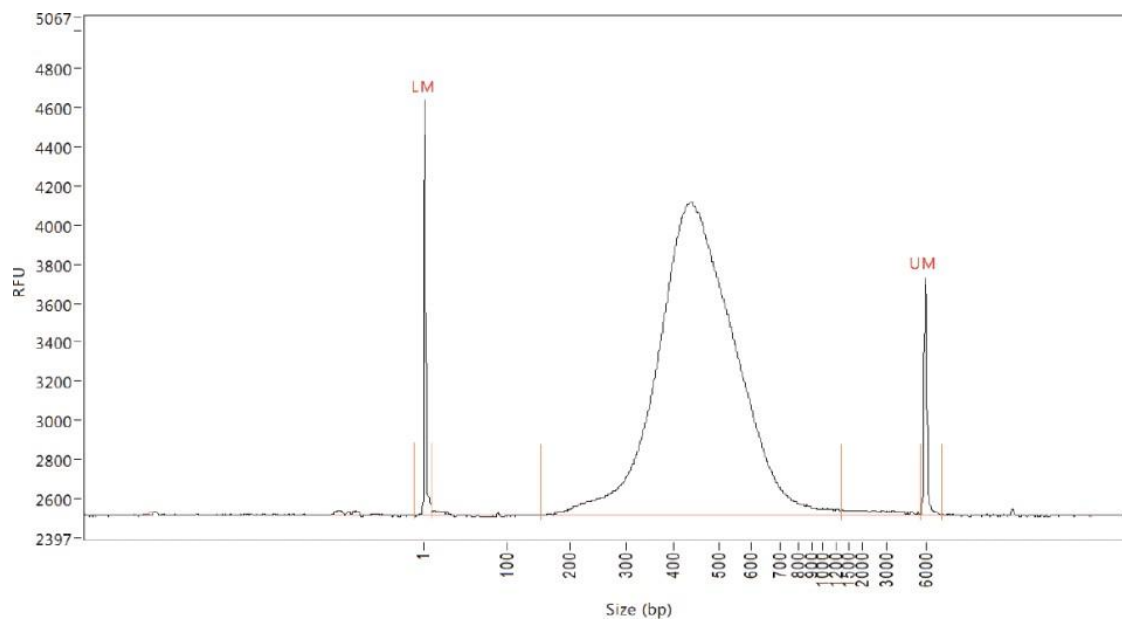
- Attrezzatura e reagenti per la quantificazione fluorometrica
- Sistema di elettroforesi capillare
- Acqua senza nucleasi
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

PROCEDURA

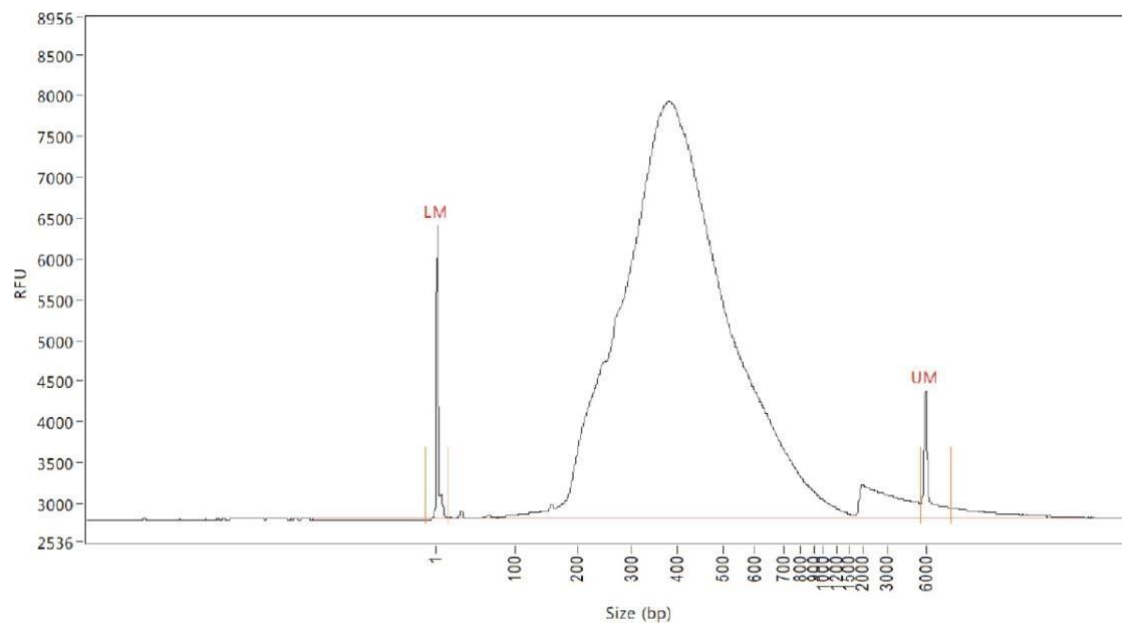
1. Preparare una diluizione quadrupla di ciascuna libreria con acqua senza nucleasi (ad es., 2 μ l di biblioteca in 6 μ l di acqua senza nucleasi).
2. Quantificare le librerie con un metodo fluorometrico (ad es. quantificazione con Qubit HS utilizzando 2 μ l della diluizione quadrupla della libreria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

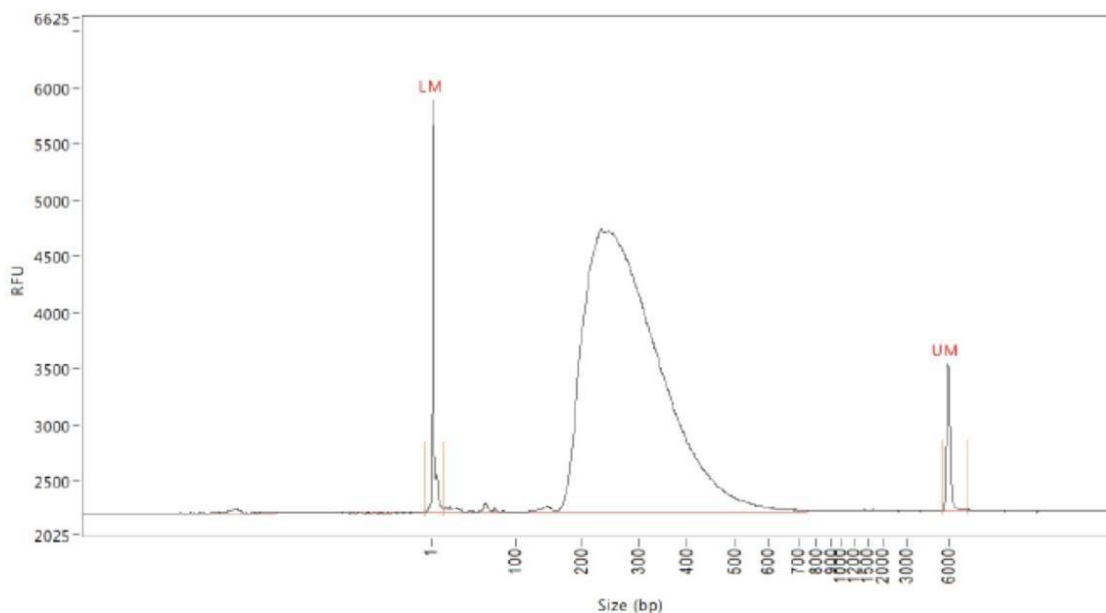


- Controllare la qualità delle librerie analizzandone il profilo tramite elettroforesi capillare. I frammenti di DNA della libreria dovrebbero avere una distribuzione delle dimensioni fra 200 bp e 800 bp.



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





Esempi di distribuzione della libreria di DNA ottenuta con sistema di elettroforesi capillare Agilent Fragment Analyzer. UM: Marcatore superiore, LM : Marcatore inferiore

5.3. Cattura

5.3.1. Pooling della libreria

MATERIALI

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

PROCEDURA

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

NUMERO DI CATTURE (Fare riferimento alla tabella del punto 3)	1	2	3	4
Human Cot DNA (in μ l)	5	11	16,5	22
Universal Blockers - TS Mix (in μ l)	2	4,4	6,6	8,8



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

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

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



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

Procedere all'ibridazione per eseguire un'incubazione notturna.

5.3.2. Ibridazione

MATERIALI

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

PREPARAZIONE

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



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



PROCEDURA

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

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

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

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

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

PREPARAZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO PER 1 REAZIONE

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



Importante: Preriscaldare 1x tampone stringente e un'aliquota di 110 μl di 1x tampone di lavaggio I a 65 °C in un termoblocco o a bagnomaria per almeno 2 ore. Tenere il restante tampone di lavaggio I a temperatura ambiente.



PREPARAZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO PER 2 REAZIONI

TAMPONE	TAMPONE STOCK (μl)	ACQUA (μl)	VOLUME FINALE 1X (μl)
10x tampone di lavaggio I	66	594	660
10x tampone di lavaggio II	44	396	440
10x tampone di lavaggio III	44	396	440
10x tampone di lavaggio stringente	88	792	880
2x tampone di lavaggio sfere	550	550	1100



Importante: Preriscaldare 1x tampone stringente e un'aliquota di 220 μl di 1x tampone di lavaggio I a 65 °C in un termoblocco o a bagnomaria per almeno 2 ore. Tenere il restante tampone di lavaggio I a temperatura ambiente.

PREPARAZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO PER 3 REAZIONI

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



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

PREPARAZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO PER 4 REAZIONI

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



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



5.3.3. Preparazione delle sfere di streptavidina

MATERIALI

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

PROCEDURA

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

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



Importante: Non lasciar asciugare le sfere.

Procedere immediatamente al legame dei target ibridati alle sfere.

5.3.4. Legame di target ibridati alle sfere

MATERIALI

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



PROCEDURA

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

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

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



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

MATERIALI

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

PROCEDURA



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

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

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

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

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

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



7. Ripetere i passaggi da 4 a 6 una volta.

Lavorare a temperatura ambiente.

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

Nota: Se si lavora con 2 o più provette di cattura, da questo passaggio in avanti, processare tutte le provette allo stesso tempo.

9. Agitare per 2 minuti.
10. Posizionare le provette su un rack magnetico e lasciar riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
11. Aggiungere 200 μ l di 1x tampone di lavaggio II a ciascuna provetta. Agitare per 1 minuto.
12. Posizionare le provette su un rack magnetico e lasciar riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
13. Aggiungere 200 μ l di 1x tampone di lavaggio III a ciascuna provetta. Agitare per 30 secondi. Centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
14. Posizionare le provette su un rack magnetico e lasciar riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
15. Aggiungere 200 μ l di 1x IDTE a ciascuna provetta. Risospendere le sfere. Centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
16. Posizionare le provette su un rack magnetico e lasciar riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
17. Rimuovere tutto il liquido rimanente utilizzando una pipetta P10 o P20.
18. Aggiungere 20 μ l di acqua senza nucleasi a ciascuna provetta, risospendere e trasferire la miscela di sfere/acqua in una nuova provetta PCR.



5.3.6. Amplificazione post-cattura

MATERIALI

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

PREPARAZIONE

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

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

PROCEDURA

1. Preparare il pre-mix PCR come segue:

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



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



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

5.3.7. Pulizia post-cattura dell'amplificazione

MATERIALI

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

PROCEDURA

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

Tenere le provette sul rack magnetico per i passaggi successivi.

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

Rimuovere le provette dal rack magnetico.

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



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

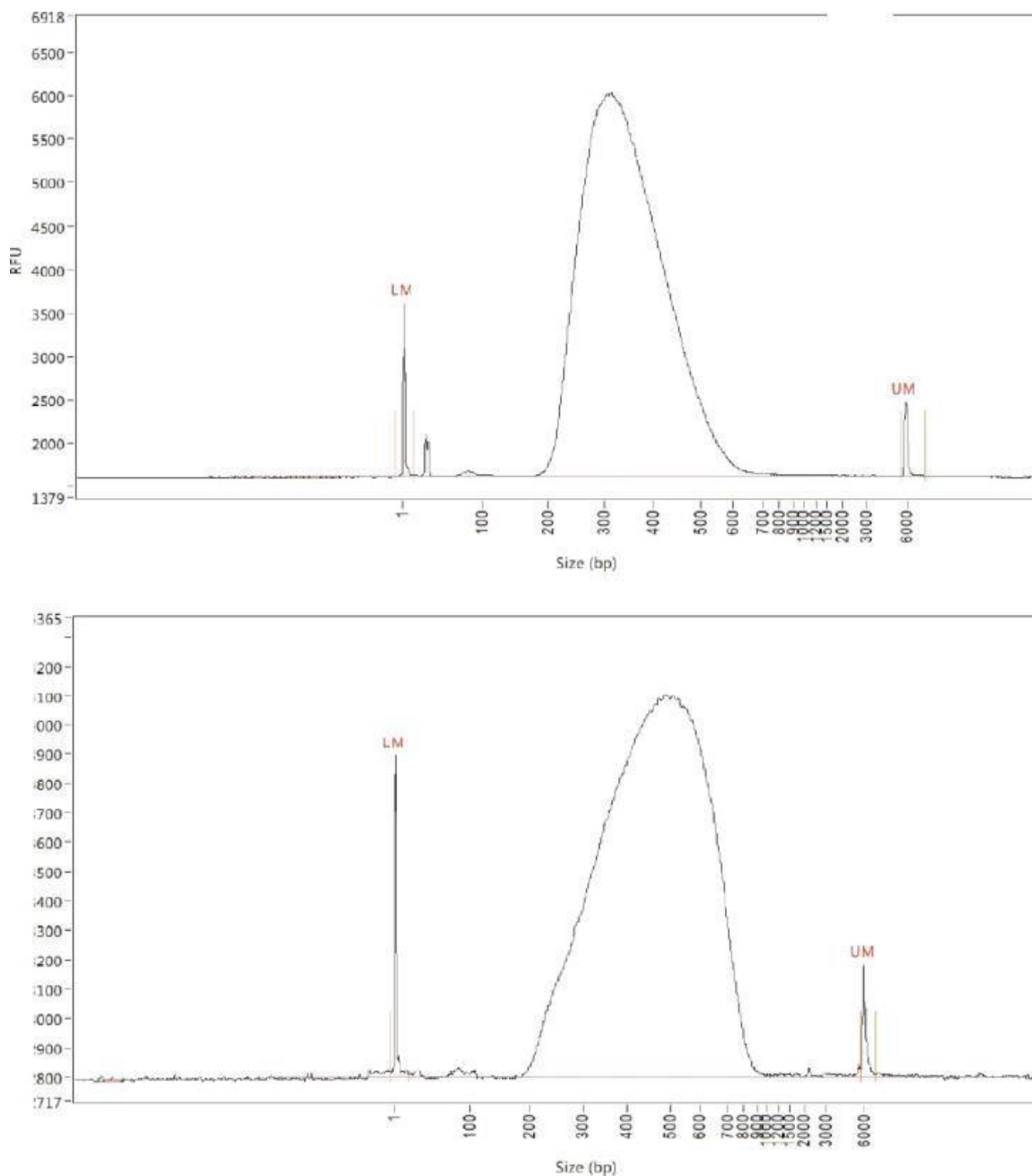
5.3.8. Quantificazione finale della libreria e controllo qualità

MATERIALI

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

PROCEDURA

1. Quantificare tutti i pool della libreria catturati con un metodo fluorometrico (ad es. quantificazione con Qubit HS utilizzando 2 μ l della libreria).
2. Controllare la qualità del pool di librerie catturato analizzandone il profilo tramite elettroforesi capillare. I frammenti di DNA della libreria dovrebbero avere una distribuzione delle dimensioni fra 200 bp e 800 bp.



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



5.4. Sequenziamento

5.4.1. Preparazione della libreria per il sequenziamento

MATERIALI

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

PROCEDURA

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

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

2. Diluire ciascun pool a 4 nM e mescolarli in quantità uguali (ad es. 5 μl di ciascuno). Mescolare bene e usare questa diluizione secondo le raccomandazioni sulla denaturazione dello standard Illumina®.
3. Caricare una diluizione di 10 pM delle librerie denaturate su MiSeq®.
4. Le letture minime raccomandate sono 2,1 milioni di letture per campione, con una lunghezza di lettura di 150 bp.

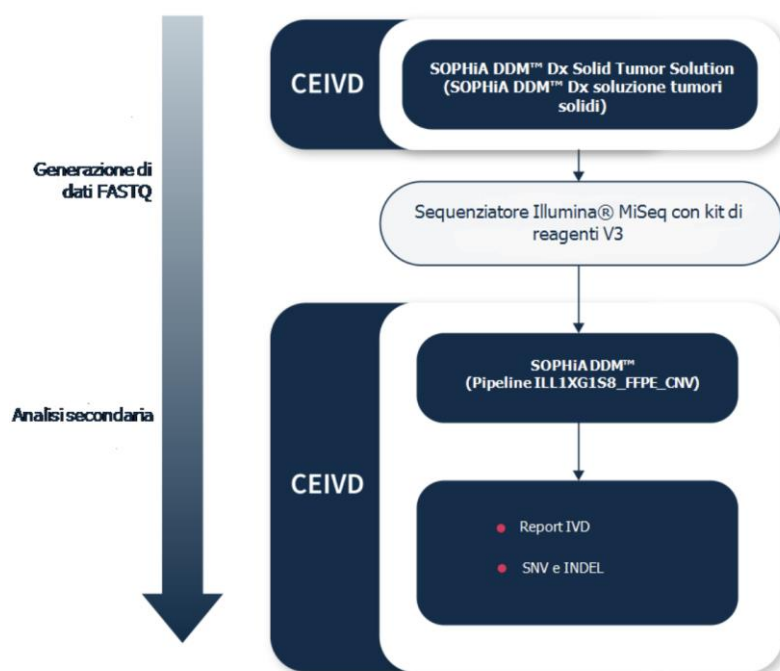


6. PROCEDURA DI ANALISI

6.1. Modalità SOPHiA DDM™ Dx Istruzioni per l'installazione

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

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



Descrizione del flusso di lavoro di analisi per SOPHiA DDM™ Dx Solid Tumor Solution

Si invita a fare riferimento al manuale utente della modalità SOPHiA DDM™ Dx per la descrizione completa del flusso di lavoro di upload.



7. LIMITAZIONI, AVVERTENZE E PRECAUZIONI

AVVERTENZE GENERALI

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

LIMITAZIONI GENERALI

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



SNV / INDEL

- Il rilevamento delle varianti in questo prodotto è stato ottimizzato per il rilevamento degli SNV e degli INDEL corti (fino a 1/2 della lunghezza della lettura). Si noti che qualsiasi altro tipo di alterazione può essere mancato dall'algoritmo.
 1. Le fusioni o inversioni geniche non possono essere rilevate.
 2. Delezioni o inserzioni con un breakpoint al di fuori della regione target potrebbero non essere rilevate.
- Il rilevamento delle varianti in questo prodotto è stato ottimizzato sulle regioni definite come “regioni target”. Si noti che le regioni al di fuori di questa definizione potrebbero generare falsi negativi e/o falsi positivi.
- Per una buona prestazione dell'algoritmo, si raccomanda una copertura di almeno 1.000x per soddisfare la significatività statistica rispetto al rumore per la maggior parte delle posizioni. Una copertura inferiore aumenterà significativamente il rischio di chiamate di varianti false negative.
- Le varianti possono essere mancate o chiamate erroneamente a causa di limitazioni nel design del kit. Le varianti nelle regioni per le quali il relativo frammento di DNA non viene estratto dalle sonde non possono essere rilevate dal prodotto. La cattura delle varianti può essere limitata da:
 1. INDEL che influenzano l'ibridazione delle sonde. Questo può portare all'assenza di rilevamento o a una stima errata della frazione della variante.
 2. La presenza di una o più mutazioni aggiuntive nella regione target della sonda sullo stesso allele.
- SNV o INDEL in omopolimeri con una lunghezza di dieci coppie di base o superiore non possono essere chiamati in modo attendibile dal momento che il loro rilevamento è confuso da un elevato rumore di fondo.
- Potrebbero essere segnalate varianti deletion-insertion (delins) complesse come varianti multiple nel caso in cui vengano rappresentate nell'allineamento come più varianti più piccole separate da più di 2 nucleotidi.
- Le regioni contrassegnate nell'Appendice 4 presentano caratteristiche che rendono inattendibile il rilevamento delle varianti. Vengono segnalate con avvertenze nell'interfaccia SOPHiA DDM™, e le varianti rilevate in queste regioni vengono contrassegnate con un flag nella scheda “Avvertenze” di SOPHiA DDM™. Inoltre, la soglia di segnalazione è adattata agli errori sistematici che sono stati identificati durante la valutazione interna.
- Le regioni con un'alta omologia di sequenza possono causare incertezza nella mappatura e il rischio di perdere o chiamare varianti errate. Una di queste regioni escluse dall'analisi utilizzando il flag è: Esone H3F3A 2, chr1: 226252120-226252180. È omologa a diverse altre regioni genomiche.
- Le varianti potrebbero essere rappresentate in forme diverse in una data regione. Se una parte delle letture riporta la variante in una forma diversa o non cattura la variante, la frazione di variante può essere sottostimata, o la variante può essere mancata a causa della bassa frazione.
- Nel caso di inserzioni/duplicazioni multiple presenti all'interno della stessa regione, non tutte potrebbero essere riportate correttamente. In particolare, quando un'inserzione più piccola è completamente contenuta all'interno di un'inserzione più grande, potrebbe non esserci alcuna lettura che identifichi in modo univoco l'inserzione più piccola, e quest'ultima potrebbe essere mancata e potrebbe essere riportata solo l'inserzione più grande.
- Nel caso di inserzioni/duplicazioni multiple presenti all'interno della stessa regione, non tutte potrebbero essere quantificate correttamente. In particolare, se un'inserzione più piccola è completamente contenuta all'interno di un'inserzione più grande, potrebbe non esserci alcuna lettura che identifichi univocamente l'inserzione più



piccola e la frazione di variante riportata per l'inserzione più piccola potrebbe essere sottostimata e la frazione di variante dell'inserzione più grande sovrastimata.

- Il cross-talk del campione dovuto all'index-hopping può essere aggravato dai seguenti fattori:
 1. Copertura molto alta in uno o pochi campioni a causa di problemi durante la quantificazione / normalizzazione del campione o amplificazioni geniche di alto livello
 2. Sovraccarico della cella di flusso, ovvero alta densità del cluster
 3. Differenze nel tasso di conversione delle librerie che possono essere influenzate dalla qualità del materiale di input dell'FFPE
- Il cross-talk del campione in presenza di una contaminazione dell'indice di basso livello (<1%) può essere aggravato dai seguenti fattori:
 1. Copertura molto alta in uno o pochi campioni a causa di problemi durante la quantificazione / normalizzazione del campione o amplificazioni geniche di alto livello
 2. Sovraccarico della cella di flusso, ovvero alta densità del cluster
 3. Differenze nel tasso di conversione delle librerie che possono essere influenzate dalla qualità del materiale di input dell'FFPE
- Qualsiasi problema durante la processazione di NGS o problemi di degradazione del campione può causare un basso rapporto segnale-rumore e influenzare negativamente l'accuratezza della chiamata delle varianti. In particolare, i campioni deaminati in cui si sospetta che più di 10 varianti sotto il 5% dell'AF siano il risultato della deaminazione, porteranno al filtraggio di tutte le varianti A->G e C->T sotto il 5% dell'AF.
- Le frazioni di varianti inferiori al 6% potrebbero non essere rilevate.
- Si raccomanda all'utente di interpretare con cautela le varianti segnalate al di sotto del 6% e possibilmente di usare metodi di test alternativi per confermare.



8. VALUTAZIONE DELLA PERFORMANCE NON CLINICHE

8.1. METODI

Informazioni generali

In questo studio, sono state valutate le prestazioni del kit SOPHiA DDM™ Dx STS_v1 e della pipeline SOPHiA DDM™ Dx ILL1XG1S8_FFPE_CNV con dati generati su uno strumento Illumina MiSeq® utilizzando il test SOPHiA DDM™ Dx STS_v1. Il filtraggio delle varianti è stato impostato in base al rumore di fondo misurato nei campioni di diluizione germinale, e le presenti affermazioni riguardano le varianti al di sopra del limite di rilevamento determinato dai nostri esperimenti.

Gli omopolimeri di 10 bp o più sono stati esclusi. Per ciascun campione sono state confrontate le varianti rilevate dalla pipeline con le varianti confermate "gold standard" fornite da ciascuno dei centri di sequenziamento. Le varianti rilevate al di fuori delle regioni target non sono state considerate.

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

È stata presa in considerazione ciascuna posizione che è stata analizzata sia dal metodo di riferimento che dal metodo che combina l'uso dello strumento MiSeq® e del pannello SOPHiA GENETICS STS_v1 per calcolare parametri analitici come la sensibilità, la specificità, l'accuratezza, la precisione e la coerenza.

Per tutte le posizioni coperte dal pannello SOPHiA DDM™ Dx STS_v1 e per le quali erano disponibili informazioni di riferimento, sono stati determinati i numeri delle seguenti categorie: I veri positivi (True Positives (TP)) sono presenti in entrambi i set, i falsi positivi (False Positives (FP)) sono presenti solo nelle varianti rilevate da SOPHiA DDM™ e i falsi negativi (False Negatives (FN)) sono presenti solo nella tabella delle varianti confermate. Tutte le posizioni schermate (TP+FP+TN+FN) sono state determinate sottraendo le posizioni indeterminate dalla regione target del pannello SOPHiA DDM™ Dx STS_v1, che è CDS ± 25 bp dei geni e degli esoni specificati nella documentazione SOPHiA DDM™ Dx STS_v1:

- Regioni non definite: Regioni contenenti varianti a bassa attendibilità, o varianti confermate sotto la soglia di segnalazione, e per determinare la riproducibilità e la ripetibilità, regioni sotto la profondità di 1000x per valutare la riproducibilità e la ripetibilità della copertura
- Regioni note con artefatti (regioni contrassegnate)
- Regioni in cui non erano disponibili dati di riferimento o in cui i dati erano ambigui (vedere anche 3.2.3).

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

Tutti i parametri sono stati calcolati con le seguenti formule:

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

$$\text{Ripetibilità del sequenziamento} = \frac{\sum_{i \in [SP_A \cap SP_B]} 1}{\sum_{i \in [SP_A \cup SP_B]} 1}$$

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

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

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

$$\text{Ripetibilità} = \text{Ripetibilità della variante} \times \text{Ripetibilità del sequenziamento} \times 100$$

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

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



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

8.2. DATI

I campioni disponibili sono stati raggruppati in due categorie a seconda della caratterizzazione ad alta attendibilità disponibile per i confronti di riferimento. In primo luogo, i campioni parzialmente caratterizzati in cui sono state identificate varianti note ad alta attendibilità sono stati processati da SOPHiA GENETICS (sito A) o da partner esterni (siti da B a F) con le condizioni sperimentali raccomandate. Questi risultati contengono una vasta casistica clinica rappresentativa e permettono di stimare la sensibilità per la denominazione delle varianti. Inoltre, sono stati inclusi i replicati per stimare la ripetibilità e la riproducibilità.

La seconda categoria di campioni è costituita da campioni di riferimento con regioni ad alta attendibilità date dal fornitore. Questo campione ben caratterizzato ci consente di determinare la specificità, la precisione e l'accuratezza, nonché la sensibilità, attraverso regioni che sono state caratterizzate in modo indipendente utilizzando due diversi test NGS, ciascuno su 3 replicati.

I dati di input provengono da diverse prove su più pazienti (un file di sequenza per ciascun paziente) eseguite da sei laboratori distinti: Sito A-F. Tutti i file di una prova sono stati analizzati congiuntamente come parte dello stesso processo di lotto.

8.3. CONCLUSIONI GENERALI

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

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

Prova	N. di campioni	TP	FN
SiteA_03	6	6	0
SiteA_04	3	6	0
SiteA_05	14	44	0
SiteB_01	9	37	0
SiteB_02	11	25	0
SiteB_03	13	14	0
SiteC_01	18	50	1
SiteC_02	15	33	0
SiteC_03	15	33	0
SiteD_01	14	41	0



Prova	N. di campioni	TP	FN
SiteD_02	16	29	0
SiteE_01	1627	44	0
SiteE_02	5	6	0
SiteF_01	6	10	0
SiteF_02	5	6	0
Totale	166	384	1

La seguente tabella mostra le posizioni uniche della base TN e le varianti rilevate in questo studio di valutazione della performance. Il numero totale di posizioni di base nelle regioni analizzate è stato 3.610 basi. Nello studio sono state rilevate 81 (ottantuno) varianti uniche confermate. I veri negativi unici in cui sono stati disponibili dati di riferimento ad alta attendibilità hanno coperto un totale di 3.590 bp, che a loro volta coprono il 16,8% delle regioni target (21.343 bp).

Tabella 3. Riepiloghi delle varianti in tutte le prove

TP	80
FP	0
FN	1
TN	3577

8.4. RISULTATI

La combinazione dello strumento Illumina MiSeq®, del test SOPHiA DDM™ Dx STS e di SOPHiA DDM™ Dx porta a una performance osservata del 98,77% di sensibilità, 100% di specificità, 99,97% di accuratezza, 100% di precisione, 96,54% di ripetibilità e 89,13% di riproducibilità.

Tabella 4. Riepilogo della performance

N°	Misurazione della performance	Media	5° percentile
A	Tasso on-target	77,0%	[51,7%]
B	Uniformità	98,7%	[92,5%]

N°	Misurazione della performance	Osservato*	[Limite di segnalazione]
C	Limite di rilevamento	6%	[1%]



N°	Misurazione della performance	Osservato	[IC meno del 95%]*
1	Sensibilità	98,77%	[93,31%]
2	Specificità	100%	[99,92%]
3	Accuratezza	99,97%	[99,85%]
4	Precisione	100%	[96,25%]
5	Ripetibilità	96,45%	[96,41%]
6	Riproducibilità	89,13%	[89,05%]

* Per SNV e INDEL basati su campioni di riferimento.

** L'IC al 95% è stato calcolato sulle varianti uniche nello studio di valutazione delle prestazioni al fine di riflettere la reale diversità delle varianti.

** L'IC al 95% è stato calcolato su tutte le posizioni per tutti i campioni, utilizzando la riproducibilità clinica inter-sito.



9. SIMBOLI

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



10. SUPPORTO

In caso di difficoltà nell'utilizzo della modalità SOPHiA DDM™ Dx, consultare la sezione di risoluzione dei problemi del Manuale d'uso della modalità SOPHiA DDM™ Dx disponibile su SOPHiA DDM™ Dx o contattare la nostra linea di assistenza al numero di telefono +41 21 694 10 60 o all'indirizzo e-mail support@sophiagenetics.com. Visitare il sito www.sophiagenetics.com per maggiori dettagli. È possibile richiedere assistenza anche tramite web dalla schermata Dashboard nella sezione Supporto della modalità SOPHiA DDM™ Dx.



APPENDICE 1. PIASTRE ADATTATRICI A DOPPIO INDICE

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

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



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

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

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

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



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

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



APPENDICE 2. ATTREZZATURA DI LABORATORIO USATA NEL LABORATORIO DI SOPHIA GENETICS

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

ZONA PRE-PCR	FORNITORE	NOME PRODOTTO	N° di CATALOGO
Miscelatore a vortice	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Microcentrifuga da banco (compatibile con strisce da 8 provette)	Starlab	Mini centrifuga	N2631-0007
Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti	Alpaqua	96S Super Magnet Plate	A001322
Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti	Thermo Fisher Scientific	DynaMag-96 Side Magnet (DynaMag-96 magnete laterale)	12331D
Pipette multicanale (P10; P100; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108- 1100, S7108-3300
Termociclatore con coperchio riscaldato programmabile	Biometra	TAdvanced 96	
Attrezzatura e reagente per la quantificazione fluorometrica	Thermo Fisher Scientific	Qubit 3.0 Fluorometer (fluorometro) & Qubit dsDNA HS Assay kit (kit di test)	Q33216 & Q32854

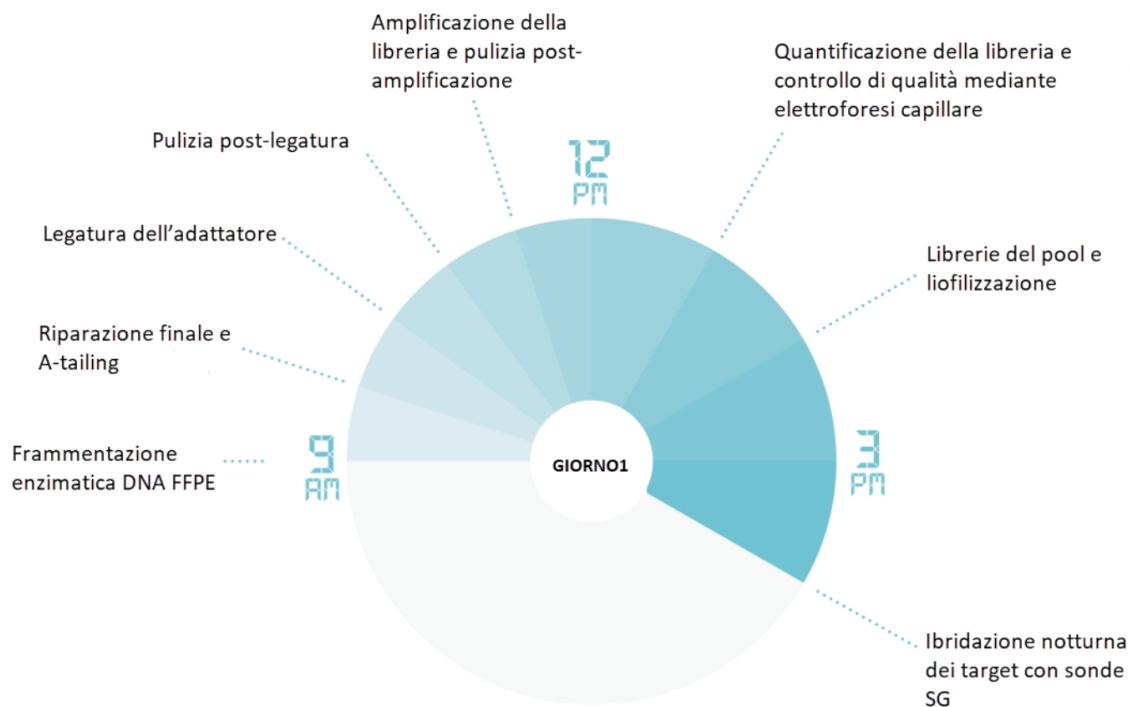


ZONA PRE-PCR	FORNITORE	NOME PRODOTTO	N° di CATALOGO
Pipette monocanale (P10; P100; P200; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100- 1100, S7100-2200, S7100-1000

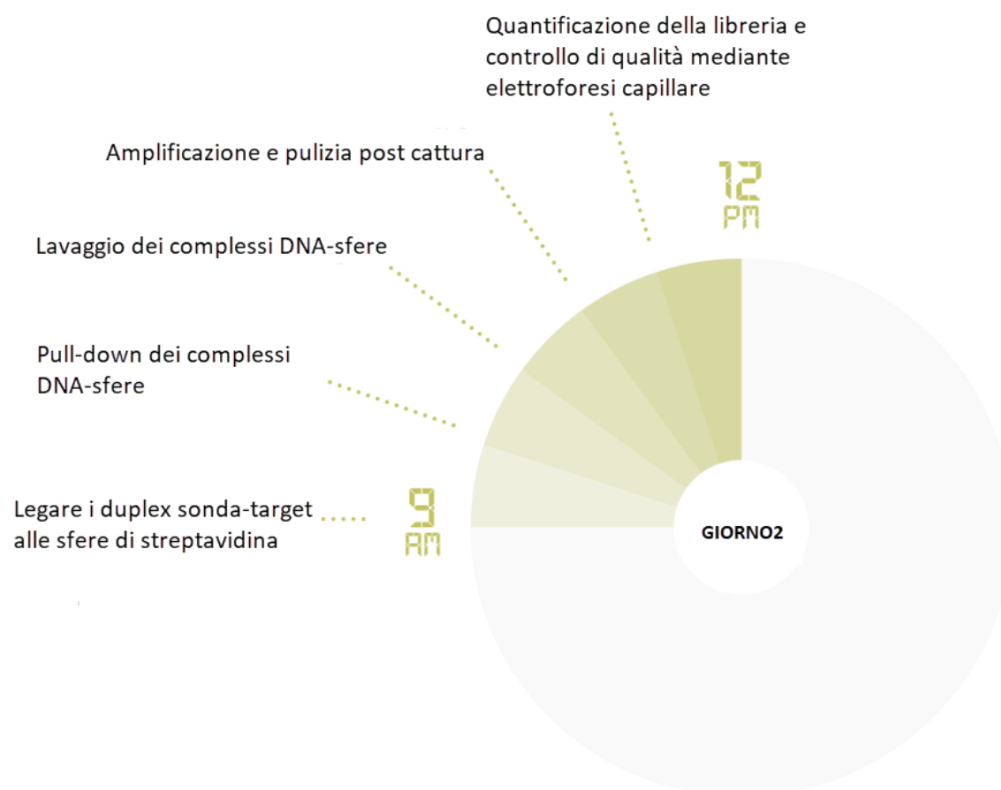
ZONA POST-PCR	FORNITORE	NOME PRODOTTO	N° di CATALOGO
Termociclatore con coperchio riscaldato programmabile	Biometra	TAdvanced 96	
Sistema di elettroforesi capillare	Advanced Analytical	Agilent Fragment Analyzer (Agilent analizzatore frammenti)	
Concentratore di vuoto (SpeedVac™ o simile)	Thermo Fisher Scientific	Savant DNA120-230	
Riscaldatore a blocco secco o bagnomaria (compatibile con provette da 1,5 ml)	Techne	Dri-Block DB-1	
Rack a separazione magnetica (compatibile con provette da 1,5 ml)	Thermo Fisher Scientific	MagJET Separation Rack (MagJET rack di separazione), 12 provette da 1,5 ml	MR02
Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti	Alpaqua	96S Super Magnet Plate	A001322
Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti	Thermo Fisher Scientific	DynaMag-96 Side Magnet (DynaMag-96 magnete laterale)	12331D
Miscelatore a vortice	Grant instrument	Miscelatore a vortice multi-provetta, V32	
Miscelatore a vortice	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Microcentrifuga da banco (compatibile con strisce da 8 provette)	StarLab	Mini centrifuga	N2631-0007
Pipette multicanale (P10; P100; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108- 1100, S7108-3300
Attrezzatura e reagente per la quantificazione fluorometrica	Thermo Fisher Scientific	Qubit 3.0 Fluorometer (fluorometro) & Qubit dsDNA HS Assay kit (kit di test)	Q33216 & Q32854
Pipette monocanale (P10; P100; P200; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100- 1100, S7100-2200, S7100-1000



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



Preparazione libreria
Con KAPA™ HYPERPLUS Kit



CATTURA

FLUSSO DI LAVORO FACILE

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



APPENDICE 4. ELENCO DELLE REGIONI TARGET E REGIONI PROBLEMATICHE APPLICABILI

REGIONI TARGET*

Regioni target		
CROMOSOMA	INIZIO	FINE
1	115252179	115252359
1	115256410	115256609
1	115258660	115258791
1	162748359	162748529
1	226252119	226252180
2	29432641	29432754
2	29436839	29436957
2	29443561	29443711
2	29445199	29445284
2	29445372	29445483
2	198266113	198266259
2	198266455	198266622
2	198266698	198266864
2	209113082	209113394
2	212566681	212566901
2	212570032	212570126
3	12626619	12626635
3	12627269	12627290
3	12629089	12629110
3	12632286	12632483
3	12641199	12641250
3	12645624	12645798
3	41265962	41266274
3	138664423	138664550
3	138664919	138665574



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
3	178916859	178916965
3	178917467	178917697
3	178922319	178922330
3	178927963	178928136
3	178935987	178936132
3	178951871	178952162
4	1803551	1803762
4	1806047	1806257
4	1807846	1807910
4	1808262	1808420
4	55140997	55141150
4	55144052	55144183
4	55151967	55152140
4	55589739	55589874
4	55592012	55592226
4	55593373	55593500
4	55593561	55593728
4	55594166	55594297
4	55599225	55599368
4	55602653	55602785
4	153245325	153245556
4	153247147	153247393
4	153249349	153249551
4	153250813	153250947
4	153251873	153252030
5	1258776	1258787
5	1268743	1268754
5	1271227	1271238
5	1271317	1271328
5	1295080	1295297
6	26031867	26032298
6	117630054	117630070



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
6	117638334	117638350
7	6431544	6431682
7	55241603	55241746
7	55242404	55242523
7	55248975	55249181
7	55259401	55259577
7	116339128	116340348
7	116411837	116412069
7	116414924	116415175
7	116417432	116417533
7	116418819	116419021
7	116422031	116422161
7	116423347	116423533
7	116435698	116435855
7	140453064	140453203
7	140481365	140481503
8	38272286	38272429
8	38274813	38274944
9	21968217	21968251
9	21970890	21971217
9	21974666	21974836
9	80409368	80409518
9	80412425	80412574
10	43609917	43610194
10	43613810	43613938
10	43615518	43615661
10	43617383	43617474
10	123247494	123247637
10	123257998	123258129
10	123279482	123279693
11	533442	533622
11	533755	533954



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
11	534201	534332
11	17741319	17741969
12	25378537	25378717
12	25380157	25380356
12	25398197	25398328
12	58145272	58145510
12	112888111	112888326
14	95557529	95557712
14	95560214	95560503
14	105246414	105246563
15	66727354	66727585
15	66729073	66729240
15	90631808	90631989
17	7572916	7573018
17	7573894	7574043
17	7576839	7577170
17	7577449	7577660
17	7578114	7578570
17	7579264	7579600
17	7579664	7579731
17	7579824	7579922
17	37868170	37868310
17	37879561	37879720
17	37880968	37881174
17	73775139	73775155
18	48586225	48586296
18	48591782	48591986
18	48593378	48593567
18	48602997	48603156
18	48604615	48604847
19	3114931	3115080
19	3118911	3119061



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
20	57484394	57484488

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

REGIONI CONTRASSEGNALE APPLICABILI**

CROMOSOMA	INIZIO	FINE	DESCRIZIONE
1	226252120	226252180	Questa regione è altamente omologa alle seguenti regioni: chr2:175584612-175584763 (intergenica), chrX:122648386-122648447 (intergenica) e chr4:140619580-140619731 (regione intronica di MGST2), e le varianti possono essere confuse a causa della bassa mappabilità

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



Document Approvals
Approved Date: 28 Jan 2026

Approval Verdict: Approve	Coleman Spence, (cspence@sophiagenetics.com) Regulatory Approval 28-Jan-2026 01:12:35 GMT+0000
QA Approval Verdict: Approve	Claire Mullane, (cmullane@sophiagenetics.com) Quality Assurance Approval 28-Jan-2026 08:58:03 GMT+0000