

INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

16, 32, 48 ȘI 96 DE PROBE

SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution



Pentru diagnostic in vitro (IVD)
Nu este destinat autotestării

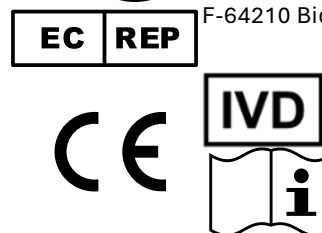
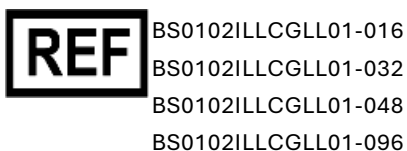
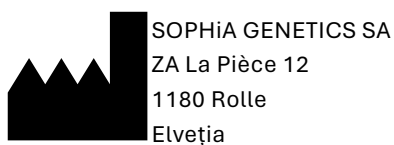




INFORMAȚII SINTETIZATE

Denumirea produsului	SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution
Tip produs	Protocol combinat
Familia de produse	Soluție de diagnostic molecular (kit + componentă analitică)
ID algoritm	ILL1XG1G6_CNV
ID panou genetic	HCS v1.1
Versiunea produsului	1.1
Tipul probei	ADN germinal izolat din sânge periferic
Secvențiator	Illumina - MiSeq
Descriere GMDN	Kit de reactivi IVD / Software de interpretare pentru analiza genomică umană
ID document	SG-09158
Versiunea documentului	v1.0
Data revizuirii	7 Aprilie 2026

Aceste instrucțiuni de utilizare (IFU) sunt valabile pentru toate versiunile SOPHiA DDM™ Dx.
Vă rugăm să citiți cu atenție IFU înainte de a utiliza acest produs.





CODURI DE PRODUS

	CODUL COMPLET AL PRODUSULUI	BOX 1	BOX 2	KIT DE PREGĂTIRE A BIBLIOTECII
REF	BS0102ILLCGLL01-016	B1.01.0002.C-16	B2.0001.C-16	700232
	BS0102ILLCGLL01-032	B1.01.0002.C-32	B2.0001.C-32	700232
	BS0102ILLCGLL01-048	B1.01.0002.C-48	B2.0001.C-48	700234
	BS0102ILLCGLL01-096	B1.01.0002.C-96	B2.0001.C-48	700234



DISCLAIMER

Acest document și conținutul său sunt proprietatea SOPHiA GENETICS SA și a afiliaților săi („SOPHiA GENETICS”) și sunt destinate exclusiv utilizării contractuale de către clientul său în legătură cu utilizarea produsului (produselor) descris(e) în acest document și în niciun alt scop. Prezentul document și conținutul său nu pot fi utilizate sau distribuite în niciun alt scop și/sau comunicate, divulgate sau reproduse în niciun alt mod și nu se poate face referire la acestea fără acordul prealabil scris al SOPHiA GENETICS.

Prin acest document, SOPHiA GENETICS nu conferă nicio licență în temeiul drepturilor sale de brevet, de marcă, de autor sau de drept comun, nici în temeiul drepturilor similare deținute de terți. Instrucțiunile din acest document trebuie respectate cu strictețe și în mod explicit de către personalul calificat și instruit corespunzător pentru a asigura utilizarea corectă și sigură a produsului (produselor) descris(e) în acest document. Întregul conținut al acestui document trebuie citit și înțeles în totalitate înainte de a utiliza produsul (produsele) în cauză.

NECITIREA COMPLETĂ ȘI NERESPECTAREA EXPLICITĂ A TUTUROR INSTRUCȚIUNILOR CONȚINUTE ÎN PREZENTUL DOCUMENT POATE DUCE LA DETERIORAREA PRODUSULUI (PRODUSELOR), LA VĂTĂMAREA CORPORALĂ A PERSOANELOR, INCLUSIV A UTILIZATORILOR SAU A ALTOR PERSOANE, ȘI LA ALTE DAUNE MATERIALE.

SOPHiA GENETICS NU ÎȘI ASUMĂ NICIO RESPONSABILITATE CARE REZULTĂ DIN UTILIZAREA NECORESPUNZĂTOARE A PRODUSULUI (PRODUSELOR) DESCRIS(E) ÎN PREZENTUL DOCUMENT (INCLUSIV A COMPONENTELOR SAU SOFTWARE-URILOR ACESTORA).

MĂRCI COMERCIALE

Illumina® și MiSeq® sunt mărci comerciale înregistrate ale Illumina, Inc.

AMPure® și Agencourt® sunt mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc.

Qubit® și Dynabeads® sunt mărci înregistrate ale Thermo Fisher Scientific Inc.

KAPA™ este o marcă comercială a Roche.

QIAseq® este o marcă înregistrată a Qiagen.

SOPHiA GENETICS™ și SOPHiA DDM™ Dx sunt mărci comerciale ale SOPHiA GENETICS SA și/sau ale afiliaților săi în S.U.A. și/sau în alte țări. Toate celelalte denumiri, logo-uri și alte mărci comerciale sunt proprietatea proprietarilor respectivi. CU EXCEPȚIA CAZULUI ÎN CARE SE PRECIZEAZĂ EXPRES ALTCEVA, UTILIZAREA DE CĂTRE SOPHiA GENETICS A MĂRCILOR COMERCIALE ALE TERȚILOR NU IMPLICĂ NICIUN FEL DE RELAȚIE, SPONSORIZARE SAU APROBARE ÎNTRE SOPHiA GENETICS ȘI TITULARII ACESTOR MĂRCI. Orice referire a SOPHiA GENETICS la mărcile comerciale ale terților are ca scop identificarea bunurilor și/sau serviciilor corespunzătoare ale terților și va fi considerată utilizare corectă nominativă în conformitate cu legislația privind mărcile comerciale.



ISTORICUL REVIZUIRII

ID/VERSIUNE DOCUMENT	Versiune		DESCRIEREA MODIFICĂRII
	echivalentă în limba engleză	DATA	
SG-09158 - 1.0	SG-00662 – 8.0	7 aprilie 2026	<ul style="list-style-type: none">Versiunea inițială



CUPRINS

1. Utilizarea prevăzută/Scopul.....	8
2. Prezentare generală a principiului/principiilor testului și a procedurii.....	9
3. Componentele produsului	10
4. Materiale și metode pentru kit	11
4.1. Considerații inițiale.....	11
4.1.1. Conținutul kitului (16, 32, 48 sau 96 de probe)	11
4.1.2. Materiale necesare (nu sunt furnizate).....	15
4.2. Pregătirea bibliotecii.....	16
Genomică 5.2.1. Pregătirea ADN-ului	16
4.2.2. Prepararea preamestecurilor și a reactivilor	18
4.2.3. Fragmentarea enzimatică, repararea capetelor și A-Tailing.....	20
4.2.4. Ligare	21
4.2.5. Curățarea post-ligare	22
4.2.6. Selectarea duală a dimensiunii	23
4.2.7. Amplificarea bibliotecii	24
4.2.8. Curățarea după amplificare	26
4.2.9. Cuantificarea bibliotecilor individuale și controlul calității.....	27
4.3. Captură.....	28
4.3.1. Gruparea bibliotecilor	28
4.3.2. Hibridizarea.....	29
4.3.3. Pregătirea bilelor magnetice de streptavidină	31
4.3.4. Legarea țintei hibridizate la bilele magnetice	32
4.3.5. Spălarea bilelor magnetice de streptavidină pentru a îndepărta ADN-ul nelegat	33
4.3.6. Amplificarea post-captură	35
4.3.7. Curățarea amplificării post-captură	36
4.3.8. Cuantificarea finală a bibliotecii și controlul calității	37
4.4. Secvențierea	38
4.4.1. Pregătirea bibliotecii pentru secvențiere	38
5. Procedura de analiză.....	39
5.1. Instrucțiuni de instalare a modului SOPHiA DDM™ Dx	39
5.2. Descrierea fluxului de lucru de analiză pentru generarea rezultatelor IVD	39
6. Limitări, avertismente și măsuri de precauție	40
7. Evaluarea performanțelor neclinice.....	43
7.1. CARACTERISTICI DE PERFORMANȚĂ ANALITICĂ.....	43
7.2. METODE	43
7.3. DATE (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0).....	45
7.4. CONCLUZII GENERALE (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0).....	45
7.5. REZULTATE (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0).....	47
7.6. STUDIU DE CORELARE DE TIP BRIDGING (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1).....	47



7.7. CONCLUZII	48
8. Simboluri	49
9. Asistență.....	50
Anexa 1. Plăci adaptoare cu index dublu.....	51
Anexa 2. Echipamente de laborator utilizate în laboratorul SOPHiA GENETICS	54
Anexa 3. Flux de lucru general – Soluții de captură SOPHiA DDM™	57
Anexa 4. Lista regiunilor țintă, aplicabile problematice și regiuni marcate.....	59



1. UTILIZAREA PREVĂZUTĂ/SCOPUL

SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS) este un test de diagnostic in vitro destinat identificării variantelor germinale prezente în cele mai frecvente 27 de gene implicate în predispoziția la cancerul de sân și ovarian, precum și la cancerul intestinal, în probe de ADN germinal izolate din sângele periferic (Tabelul 1). SOPHiA DDM™ Dx HCS este un test de secvențiere de nouă generație (NGS) realizat pe instrumentul Illumina MiSeq® și este destinat a fi utilizat ca suport pentru profesioniștii din domeniul sănătății, precum și pentru a oferi argumentația moleculară necesară în vederea luării unei decizii clinice în legătură cu mutațiile germinale asociate bolilor enumerate în Tabelul



2. PREZENTARE GENERALĂ A PRINCIPIULUI/PRINCIPIILOR TESTULUI ȘI A PROCEDURII

Funcția validată a componentei analitice SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS) este de a analiza datele brute NGS generate de un instrument Illumina® MiSeq®, utilizând MiSeq® Reagent Kit v3, pe probe germinale pregătite cu SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I.

SOPHiA DDM™ Dx HCS implică trei etape principale. Prima etapă este calificarea probei de ADN care poate fi utilizată pentru test. A doua etapă este pregătirea manuală a probelor pentru secvențiere, care se numește pregătirea bibliotecii. Pregătirea bibliotecii constă în șapte pași cheie: Fragmentarea ADN-ului, ligarea adaptorilor, amplificarea prin PCR a bibliotecilor individuale, gruparea bibliotecilor, hibridizarea sondelor, captarea și amplificarea prin PCR post-captare. A treia procedură constă în secvențierea probei pregătite utilizând chimia SBS (secvențiere prin sinteză) pe secvențiatorul Illumina® MiSeq®.

Pentru analiză, rezultatele trebuie încărcate în modul SOPHiA DDM™ Dx și analizate utilizând aplicația SOPHiA DDM™ Dx HCS.

Rețineți că rezultatele unei analize genetice trebuie interpretate numai de către un expert calificat în genetică moleculară: (cum ar fi un genetician de laborator clinic înregistrat la nivel european (ErCLG), certificat de European Board of Medical Genetics (EBMG)).

Tabelul următor prezintă genele care sunt vizate de SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS), care se regăsesc adesea în diferite sindroame de cancer ereditar.

Tabelul 1: Gene vizate de SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS)

ABRAXAS1	EPCAM	PMS2
APC	MLH1	PMS2CL
ATM	MRE11A	PTEN
BARD1	MSH2	RAD50
BRCA1	MSH6	RAD51C
BRCA2	MUTYH	RAD51D
BRIP1	NBN	STK11
CDH1	PALB2	TP53
CHEK2	PIK3CA	XRCC2



3. COMPONENTELE PRODUSULUI

SOPHiA DDM™ Dx HCS este alcătuit din două componente: kitul NGS și pipeline-ul bioinformatic, utilizate în combinație cu un accesoriu IVD, modul SOPHiA DDM™ Dx bazat pe cloud.

- Scopul kitului NGS este de a pregăti și îmbogăți bibliotecile de ADN din probe de sânge adecvate pentru secvențierea pe un secvențiator Illumina® MiSeq®. Kitul NGS permite utilizatorilor să genereze date de secvențiere specifice. Elementele sunt descrise în următoarea Secțiune 5. Materiale și metode pentru kit - 5.1. Considerații inițiale - 5.1.1 Conținutul kitului.
- Pipeline-ul bioinformatic („pipeline-ul HCS”) prelucrează datele brute NGS prin algoritmi capabili să evalueze integritatea genomică.
- Modul SOPHiA DDM™ Dx este o aplicație web front-end disponibilă ca „software-as-a-service” (SaaS), utilizată pentru a genera un raport descărcabil pentru genele menționate în Tabelul 1 pentru SNV-uri și INDEL-uri germinale. Se aplică limitări - consultați Secțiunea 7 - Limitări, avertismente și măsuri de precauție.

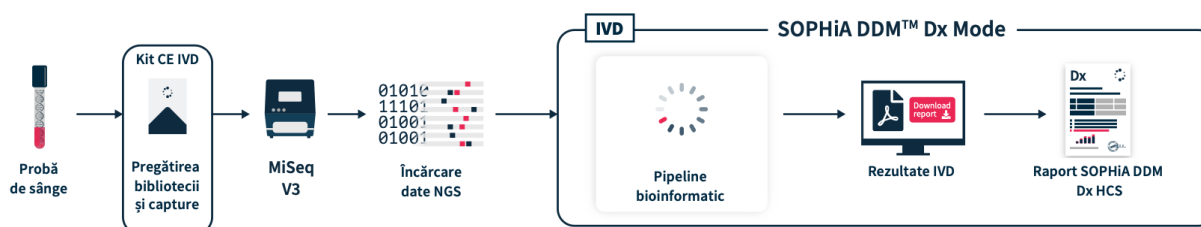


Figura 1: Prezentare generală a componentelor SOPHiA DDM Dx HCS



4. MATERIALE ȘI METODE PENTRU KIT

4.1. Considerații inițiale

Vă rugăm să vă asigurați că toate eprubetele sunt intacte din punct de vedere fizic și depozitate conform temperaturilor recomandate, la primire, pentru o performanță optimă a kitului. Manipularea și depozitarea necorespunzătoare a componentelor kitului în alte condiții pot afecta în mod negativ performanța kitului.

4.1.1. Conținutul kitului (16, 32, 48 sau 96 de probe)

Agitați întotdeauna puțin eprubetele înainte de utilizare pentru a colecta tot lichidul.

În funcție de formatul kitului, sunt furnizate următoarele componente:

COMPONENTĂ	NUMĂR DE ARTICOLE ÎN FUNCȚIE DE FORMATUL KITULUI			
	kit 16 probe	kit 32 probe	kit 48 probe	kit 96 probe
BOX 1	1	1	1	2 (48 de probe fiecare)
Adaptoare compatibile Illumina® cu index dublu (în format de placă cu 96 de godeuri incluse în Box 1)	32	32	48	96 (Placă conținută într-una din cele două Box 1s)
BOX 2	1	1	1	2 (48 de probe fiecare)
SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I	1	2 (16 probe fiecare)	1	2 (48 de probe fiecare)

BOX 1 (A SE PĂSTRA LA -25 °C PÂNĂ LA -15 °C)

- Universal Blockers - TS Mix (12 µl)
- Human Cot DNA (25 µl)
- Hereditary Cancer 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)
- În funcție de formatul kitului: 32, 48 sau 96 de adaptoare compatibile Illumina® cu index dublu în format de placă cu 96 de godeuri (7 µl fiecare): consultați Anexa 1 pentru prezentarea și secvențele adaptoarelor.

BOX 2 (A SE PĂSTRA LA +2 °C PÂNĂ LA +8 °C)

- Dynabeads® M-270 Streptavidin (440 µl)
- Agencourt® AMPure® XP (3 x 1,5 ml pentru 16 probe, 8,7 ml pentru 32 de probe și 11,6 ml pentru 48 de probe, a se vedea nota pentru 96 de probe)
- IDTE Low TE Buffer (10 ml)
- Nuclease-free water (20 ml)

Notă: Pentru 96 de probe, se furnizează de două ori caseta Box 2 de 48 de probe (a se vedea tabelul de pe pagina anterioară).



Important: Consultați secțiunea Avertismente și măsuri de precauție de mai jos pentru detalii suplimentare.

SOPHiA GENETICS™ DNA LIBRARY PREP KIT I* (A SE PĂSTRA LA -25 °C PÂNĂ LA -15 °C)

- Pentru 32 de probe, sunt furnizate două kituri de 16 probe.
- Pentru 96 de probe, sunt furnizate două kituri de 48 de probe.

COMPONENTE	FORMAT KIT	
	kit de 16 probe	kit de 48 de probe
HiFi PCR Master Mix 2x (în µl)	500	1560
Amestec de primeri pentru amplificarea bibliotecii Illumina® (în µl)	30	95
Amestec de enzimi FX (în µl)	200	625
Tampon FX 10x (în µl)	100	315
Intensificator FX (în µl)	100	315
Ligază ADN (în µl)	200	625
Tampon ligază ADN 5x (în µl)	400	1250

Important: Consultați secțiunea Avertismente și măsuri de precauție de mai jos pentru detalii suplimentare.



AVERTISMENTE ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

Denumirea produsului	Pictogramă GHS	Fraze de pericol și precauție	Cuvânt de semnalizare	Componentă periculoasă
2X Tampon de hibridizare		<ul style="list-style-type: none"> H300 Mortal în caz de înghițire. H311 Toxic în contact cu pielea. H315 Provoacă iritarea pielii. H370 Provoacă leziuni ale organelor. H370 Provoacă leziuni ale organelor (sistemul nervos central). H411 Toxic pentru mediul acvatic, cu efecte pe termen lung. P260 Nu inspirați vaporii/pulverizările. P264 Spălați bine pielea contaminată după manipulare. P270 Nu mâncați, nu beți și nu fumați când utilizați acest produs. P273 Evitați dispersarea în mediu. P280 Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/echipament de protecție a ochilor/echipament de protecție a feței. P301+P310 În caz de înghițire: sunați imediat la un centru de informare toxicologică sau un medic. P302+P352 În caz de contact cu pielea: Spălați cu multă apă. P308+P311 În caz de expunere sau de posibilă expunere: sunați la un centru de informare toxicologică sau un medic. P321 Tratament specific (consultați recomandările medicale de pe această etichetă). P330 Clățiți gura. P332+P313 În caz de iritare a pielii: consultați medicul. P362+P364 Scoateți îmbrăcăminte contaminată și spălați-o înainte de reutilizare. P391 Colectați scurgerile de produs. P405 A se depozita sub cheie. P501 Eliminați conținutul/recipientul în conformitate cu reglementările naționale. 	Pericol	<p>Clorură de tetrametil-amoniu</p> <p>Concentrație: 49% CAS: 75-57-0</p>
Intensificator tampon de hibridizare		<ul style="list-style-type: none"> H351 Susceptibil de a provoca cancer. H360 Poate dăuna fertilității sau fătului. H373 Poate provoca leziuni ale organelor în caz de expunere prelungită sau repetată. 	Pericol	<p>Formamidă</p> <p>Concentrație: 100% CAS: 75-12-7</p>



Denumirea produsului	Pictogramă GHS	Fraze de pericol și precauție	Cuvânt de semnalizare	Componentă periculoasă
		<ul style="list-style-type: none"> • P201 Procurați instrucțiuni speciale înainte de utilizare. • P202 A nu se manipula decât după ce au fost citite și înțelese toate măsurile de securitate. • P260 Nu respirați inspirați/pulverizările. • P280 Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/echipament de protecție a ochilor/echipament de protecție a feței. • P308+P313 În caz de expunere sau de posibilă expunere: consultați medicul. • P314 Consultați medicul, dacă nu vă simțiți bine. • P405 A se depozita sub cheie. • P501 Eliminați conținutul/recipientul în conformitate cu reglementările naționale. 		
10x tampon de spălare stringentă		<ul style="list-style-type: none"> • H302 Nociv în caz de înghițire. • H315 Provoacă iritarea pielii. • H319 Provoacă o iritare gravă a ochilor 	Pericol	<p>Sare disodică a acidului etilendiaminotetraacetic</p> <p>Concentrație: 2,5% CAS: 6381-92-6</p>
10x Tampon de spălare I		<ul style="list-style-type: none"> • H228 Solid inflamabil. • H302 Nociv în caz de înghițire. • H315 Provoacă iritarea pielii. • H318 Provoacă leziuni oculare grave. • H332 Nociv în caz de inhalare. • H401 Toxic pentru mediul acvatic. • H402 Nociv pentru mediul acvatic. • H412 Toxic pentru mediul acvatic, cu efecte pe termen lung. • P273 Evitați dispersarea în mediu. • P280 Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/echipament de protecție a ochilor/echipament de protecție a feței. • P305+P351+P338 În caz de contact cu ochii: clătiți cu atenție cu apă, timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți. • P310 Sunați imediat la un centru de informare toxicologică sau un medic. 	Pericol	<p>Dodecil sulfat de sodiu</p> <p>Concentrație: 4,9% CAS: 151-21-3</p>



Denumirea produsului	Pictogramă GHS	Fraze de pericol și precauție	Cuvânt de semnalizare	Componentă periculoasă
		<ul style="list-style-type: none"> P501 Eliminați conținutul/recipientul în conformitate cu reglementările naționale. 		
Tampon ligază ADN 5x		<ul style="list-style-type: none"> H335 Poate provoca iritarea căilor respiratorii. P280 Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/echipament de protecție a ochilor/echipament de protecție a feței/echipament de protecție a auzului. 	Avertisment	<p>poli(etilenglicol)</p> <p>Concentrație: 1-5%</p> <p>CAS: 9002-93-1</p>

Vă rugăm să folosiți  și  ca echipament individual de protecție.

4.1.2. Materiale necesare (nu sunt furnizate)

MATERIALE FURNIZATE DE UTILIZATOR (SE ACHIZIȚIONEAZĂ SEPARAT)

- Kit de amplificare a bibliotecii KAPA™ KK2620 (Roche Cat. Nr.: 07958978001)
- Benzi de 8 eprubete de 0,2 ml fără RNase/DNase
- Eprubete de 1,5 ml cu adsorbție redusă pentru ADN
- Eprubete de 1,5 ml
- Eprubete conice de 50 ml
- Vârfuri de pipetă cu filtru
- Etanol (grad de biologie moleculară)
- Reactivi de secvențiere Illumina®

ECHIPAMENTE DE LABORATOR

Pentru a evita contaminarea probei:

- Zona pre-PCR
 - Echipamente și reactivi de cuantificare fluorometrică
 - Suport de separare magnetică (tip 96 de godeuri)
 - Pipete multicanal (P10 sau P20; P100; P200)



- Microcentrifugă de masă (compatibilă cu benzi de 8 eprubete)
- Ciclor termic (capac încălzit programabil)
- Agitator vortex
- Zona post-PCR
 - Sistem de electroforeză capilară
 - Concentrator de vid pentru ADN
 - Bloc termic sau baie de apă (compatibile cu eprubete de 1,5 ml)
 - Echipamente și reactivi de cuantificare fluorometrică
 - Suport de separare magnetică (compatibil cu eprubete de 1,5 ml)
 - Suport de separare magnetică (tip 96 de godeuri)
 - Pipete multicanal (P10 sau P20; P100; P200)
 - Microcentrifugă de masă (compatibilă cu benzi de 8 eprubete)
 - Ciclor termic (capac încălzit programabil)
 - Agitator vortex

4.2. Pregătirea bibliotecii

Genomică 5.2.1. Pregătirea ADN-ului

MATERIALE

- ADN genomic dublu-catenar de înaltă calitate (gDNA)
- Intensificator FX
- IDTE
- Benzi de 8 eprubete de 0,2 ml fără RNase/DNase

IMPORTANT

Integritatea, concentrația și puritatea ADN-ului sunt esențiale în această etapă. Puritatea ADN-ului poate fi evaluată cu ajutorul unui spectrofotometru UV. Raporturile de absorbție recomandate sunt între 1,8 și 2,0 pentru raportul 260/280 și între 1,6 și 2,4 pentru 260/230. Recomandăm confirmarea integrității probei prin electroforeză capilară sau o tehnică echivalentă. Pentru a evita erorile legate de cantitatea de ADN introdusă, se recomandă o diluție inițială pentru obținerea unei concentrații în intervalul 50–100 ng/μl. Concentrația ADN-ului trebuie confirmată printr-o cuantificare fluorometrică (de exemplu, Qubit®, Thermo Fisher), iar valoarea obținută trebuie utilizată pentru a calcula diluția finală.



PREGĂTIRE

Scoateți Intensificatorul FX din depozitarea la -20 °C și lăsați-l să se decongeleze la temperatura camerei. După decongelare, amestecați reactivul prin răsturnarea ușoară a eprubetei de 5 ori și centrifugați scurt într-o microcentrifugă.

În funcție de formatul kitului, numărul de probe ADN care trebuie grupate pentru fiecare reacție de capturare variază în conformitate cu tabelul următor. Acest aspect trebuie luat în considerare înainte de a începe.

FORMAT KIT	kit de 16 probe	kit de 32 de probe	kit de 48 de probe	kit de 96 de probe*
Numărul de biblioteci individuale per captură	4	8	12	12

* Pentru 96 de probe sunt furnizate două kituri de 48 de probe, care includ 8 reacții de capturare.

PROCEDURĂ

1. Pregătiți următoarele benzi PCR în funcție de numărul de reacții:

NUMĂRUL DE REACȚII	4	8	12	16	24	32	48
Bandă PCR	4 eprubete	4 eprubete	4 eprubete	8 eprubete	8 eprubete	8 eprubete	8 eprubete
Număr de benzi	1	2	3	2	3	4	6

2. Se prepară o diluție pentru fiecare probă de ADN genomic de înaltă calitate (gDNA) în numărul corespunzător de benzi PCR, în felul următor:

DILUAREA gDNA	
gDNA	200 ng
IDTE	Completați la 30 μl

- Amestecați scurt prin pipetări ușoare în sus și în jos de 5 ori, urmate de o centrifugare scurtă într-o microcentrifugă pentru a colecta tot lichidul.



Sfat: punct de oprire sigur peste noapte la 4 °C.

- În funcție de numărul de probe, procedați după cum urmează:
 - Dacă se procesează **4 probe**, se adaugă 5 μl de intensificator FX în fiecare eprubetă din banda de 4 eprubete care conține 30 μl de probe de gDNA (în total 35 μl în fiecare eprubetă din banda de 4 eprubete).
 - Dacă se procesează **8 sau mai multe probe**, procedați după cum urmează:



- a. Pentru a facilita pipetarea, creați un rezervor de intensificator FX prin adăugarea următoarelor volume la un nou set de benzi cu 4 sau 8 eprubete, în conformitate cu următoarea schemă:

NUMĂRUL DE REACȚII	8	12	16	24	32	48
Bandă PCR (1 bandă)	4 eprubete	4 eprubete	8 eprubete	8 eprubete	8 eprubete	8 eprubete
Intensificator FX (în μ l)	11,5	17,5	11,5	17,5	24	36

- b. Folosind o pipetă multicanal, adăugați 5 μ l de intensificator FX din eprubetele de mai sus la 30 μ l de probe de gDNA (în total 35 μ l în fiecare eprubetă din benzile de 4 sau 8 eprubete).
- Folosind o pipetă multicanal configurată la 20 μ l, amestecați ușor prin pipetări în sus și în jos de 5 ori și centrifugați scurt într-o microcentrifugă.
3. Se păstrează la gheață până la configurarea reacției de fragmentare enzimatică.

4.2.2. Prepararea preamestecurilor și a reactivilor

COMPONENTE ȘI REACTIVI

- Amestec de enzimi FX
- Tampon FX 10x
- Tampon ligază ADN 5x
- Ligază ADN
- HiFi PCR Master Mix 2x
- Amestec de primeri pentru amplificarea bibliotecii Illumina®
- Apă fără conținut de nuclează
- Bile magnetice AMPure® XP
- Etanol

PREGĂTIRE

- Scoateți componentele SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I din depozitarea la -20 °C și decongelează-le pe gheață.
- Scoateți placa cu adaptoare cu index dublu din depozitarea la -20 °C și puneți-o în frigider la 4 °C pentru utilizare ulterioară.
- Scoateți bilele magnetice AMPure® XP din depozitarea la 2-8 °C și lăsați-le să se echilibreze la temperatura camerei timp de cel puțin 30 de minute.
- Preparați etanol proaspăt 80% (volumul în conformitate cu următoarea schemă, în funcție de numărul de reacții):

ETANOL 80%							
Numărul de reacții	4	8	12	16	24	32	48
Etanol 80% (în ml)	10	20	30	30	40	50	70



- După ce componentele SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I sunt decongelate, amestecați reactivii prin răsturnarea eprubetei de 5-10 ori și centrifugați scurt într-o microcentrifugă.

PREAMESTECTURI

1. Pregătiți **preamestecul de reacție FX** după cum urmează:

PREAMESTEC DE REACȚIE FX							
Numărul de reacții	4	8	12	16	24	32	48
Tampon FX 10x (în μ l)	23,6	47,1	75	95	150	190	300
Amestec de enzimi FX (în μ l)	47,1	94,2	150	190	300	380	600

- Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori și centrifugați scurt.
- Păstrați la gheață.

2. Pregătiți **preamestecul de ligare** după cum urmează:

PREAMESTEC DE LIGARE							
Numărul de reacții	4	8	12	16	24	32	48
Tampon de ligare ADN 5x (în μ l)	95	190	300	380	600	760	1200
Ligază ADN (în μ l)	47,5	95	150	190	300	380	600
Apă fără conținut de nuclează (în μ l)	71,3	142,5	225	285	450	570	900

- Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori și centrifugați scurt.
- Păstrați la gheață.

Important: tamponul de ligare ADN este foarte vâscos; pipetați ușor și asigurați-vă că obțineți un preamestec de ligare omogen.

3. Pregătiți **preamestecul PCR** după cum urmează:

PREAMESTEC PCR							
Numărul de reacții	4	8	12	16	24	32	48
HiFi PCR Master Mix 2x (în μ l)	115	230	345	460	690	920	1380



PREAMESTEC PCR							
Amestec de primeri pentru amplificarea bibliotecii Illumina® (în µl)	6,9	13,8	20,7	27,6	41,4	55,2	82,8
Apă fără conținut de nuclează (în µl)	16,1	32,2	48,3	64,4	96,6	128,2	193,2

- Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori și centrifugați scurt.
- Păstrați la gheață.

4.2.3. Fragmentarea enzimatică, repararea capetelor și A-Tailing

MATERIALE

- gDNA dublu catenar diluat și condiționat în 35 µl
- Preamestec de reacție FX
- Benzi de 8 eprubete de 0,2 ml fără RNase/DNase

PREGĂTIRE

- Programați ciclul termic pentru fragmentarea FX cu următoarele setări:

	TEMPERATURĂ (°C)	TIMP (MINUTE)
Capac	70	-
Pasul 1	4	1
Pasul 2	32	5
Pasul 3	65	30
Mentținere	4	∞

- Porniți programul Fragmentare FX. Când blocul ajunge la Pasul 1 (4 °C), întrerupeți programul.

PROCEDURĂ



Important: păstrați întotdeauna probele și preamestecul pe gheață înainte și după incubare pentru a bloca reacția enzimatică.

- În funcție de numărul de probe, procedați după cum urmează:
 - Dacă se procesează **4 probe**, treceți la pasul 2.



- Dacă se procesează **8 sau mai multe probe**, pentru a facilita pipetarea, creați un rezervor de preamestec Reacție FX prin adăugarea următoarelor volume la un nou set de benzi de 4 sau 8 eprubete, conform următoarei scheme:

NUMĂRUL DE REACȚII	8	12	16	24	32	48
Bandă PCR (1 bandă)	4 eprubete	4 eprubete	8 eprubete	8 eprubete	8 eprubete	8 eprubete
Preamestec de reacție FX (în μ l)	33	52,5	33	52,5	66	105

2. Pregătiți reacția după cum urmează:

- Dacă se procesează 8 sau mai multe probe, folosind o pipetă multicanal, adăugați 15 μ l de preamestec de reacție FX la fiecare dintre cele 35 μ l de probe gDNA (în total 50 μ l în benzi de 4 sau 8 eprubete).
- Folosind o pipetă setată la 40 μ l (multicanal dacă se procesează 8 sau mai multe probe), amestecați bine prin pipetări în sus și în jos de 5 ori și se centrifugați scurt într-o microcentrifugă.

3. Introduceți în ciclul termic și continuați programul de fragmentare FX.

Treceți imediat la ligare.

4.2.4. Ligare

MATERIALE

- Produsele reacției de fragmentare FX în 50 μ l fiecare
- Preamestec de ligare
- Adaptoare cu index dublu
- Benzi de 8 eprubete de 0,2 ml fără RNase/DNase

PREGĂTIRE

- Scoateți placa cu adaptoare cu index dublu de la 4 °C (transferată anterior de la -20 °C la 4 °C) și agitați scurt placa pentru a colecta tot lichidul. Consultați Anexa 1 pentru formatul plăcii respective.
- În timpul fragmentării FX, pregătiți noi benzi PCR cu 5 μ l de adaptoare cu index dublu diferite per eprubetă, în funcție de strategia dvs. de indexare, conform următoarei scheme:

NUMĂRUL DE REACȚII	4	8	12	16	24	32	48
Bandă PCR	4 eprubete	4 eprubete	4 eprubete	8 eprubete	8 eprubete	8 eprubete	8 eprubete
Număr de benzi	1	2	3	2	3	4	6

- Setati ciclatorul termic la 20 °C (cu capacul deschis).



PROCEDURĂ

- În funcție de numărul de probe, procedați după cum urmează:
 - Dacă se procesează **4 probe**, treceți la pasul 2.
 - Dacă se procesează **8 sau mai multe probe**, pentru a facilita pipetarea, creați un rezervor de preamestec de ligare într-un nou set de benzi PCR în conformitate cu următoarea schemă:

NUMĂRUL DE REACTII	8	12	16	24	32	48
Bandă PCR (1 bandă)	4 eprubete	4 eprubete	8 eprubete	8 eprubete	8 eprubete	8 eprubete
Preamestec de ligare (în μ l)	100	160	100	160	200	320

- Folosind o pipetă multicanal, transferați 50 μ l din fiecare produs al reacției de fragmentare FX la benzile de 4 sau 8 eprubete care conțin 5 μ l de adaptoare cu index dublu.
- Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori și centrifugați scurt.
- Dacă se procesează 8 sau mai multe probe, folosind o pipetă multicanal, adăugați 45 μ l de preamestec de ligare la fiecare produs al reacției de fragmentare FX (55 μ l în fiecare eprubetă a benzii de 4 sau 8 eprubete).
- Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori și centrifugați scurt.
- Incubați în ciclul termic la 20 °C timp de 15 minute (cu capacul deschis).



Important: nu puneți banda (benzile) pe gheață la sfârșitul ligării, deoarece aceasta ar putea reduce legarea ADN-ului de bilele magnetice.

Continuați cu curățarea post-ligare.

4.2.5. Curățarea post-ligare

MATERIALE

- Produse ale reacției de ligare în 100 μ l fiecare
- Bile magnetice AMPure XP echilibrate la temperatura camerei
- Etanol 80% proaspăt preparat
- Apă fără conținut de nuclează
- Benzi de 8 eprubete de 0,2 ml fără RNase/DNase



PROCEDURĂ

1. Folosind o pipetă multicanal, adăugați 80 µl de bile magnetice AMPure XP la fiecare 100 µl de produse ale reacției de ligare. Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori.
2. Incubați la temperatura camerei timp de 5 minute și centrifugați scurt pentru a colecta tot lichidul.
3. Așezați banda de 4 sau 8 eprubete pe un suport magnetic pentru format de plăci de 96 de godeuri timp de 5 minute sau până când lichidul devine transparent.
4. Eliminați cu grijă 170 µl de supernatant folosind o pipetă multicanal.

Țineți eprubetele pe suportul magnetic pentru următorii pași.

5. Folosind o pipetă multicanal, adăugați 170 µl de etanol 80% la bilele magnetice. Incubați timp de 30 de secunde până la 1 minut.
6. Eliminați cu grijă etanolul cu ajutorul unei pipete multicanal.
7. Repetați o dată pașii 5 și 6.
8. Îndepărtați etanolul rezidual cu ajutorul unei pipete multicanal P10 sau P20.
9. Lăsați bilele magnetice să se usuce la aer la temperatura camerei timp de 5 minute. Nu uscați prea mult bilele magnetice deoarece acest lucru ar putea reduce cantitatea de ADN recuperat.

Scoateți eprubetele din suportul magnetic.

10. Folosind o pipetă multicanal, adăugați 105 µl de apă fără conținut de nuclează la bilele magnetice și așteptați câteva secunde.
Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori. Incubați la temperatura camerei timp de 5 minute și centrifugați scurt pentru a colecta tot lichidul.
11. Așezați benzile de 4 sau 8 eprubete pe un suport magnetic pentru format de plăci de 96 de godeuri timp de 5 minute sau până când lichidul devine transparent.
12. Folosind o pipetă multicanal, transferați cu atenție 100 µl de supernatant la benzile noi, etichetate, cu 4 sau 8 eprubete.

Treceți la selectarea duală a dimensiunii.

4.2.6. Selectarea duală a dimensiunii

MATERIALE

- Produse de reacție ligate în 100 µl fiecare
- Bile magnetice AMPure XP echilibrate la temperatura camerei
- Etanol 80% proaspăt preparat
- IDTE
- Benzi de 8 eprubete de 0,2 ml fără RNase/DNase

PROCEDURĂ

1. Folosind o pipetă multicanal, adăugați 60 µl de bile magnetice AMPure XP la fiecare 100 µl de produse ale reacției ligate. Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori.



2. Incubați la temperatura camerei timp de 5 minute și centrifugați scurt pentru a colecta tot lichidul.
3. Așezați benzile de 4 sau 8 eprubete pe un suport magnetic pentru format de plăci de 96 de godeuri timp de 5 minute sau până când lichidul devine transparent.
4. Folosind o pipetă multicanal, transferați cu atenție 140 μ l de supernatant la benzile noi, etichetate, de 4 sau 8 eprubete, care conțin 20 μ l de bile magnetice AMPure XP. Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori.
5. Incubați la temperatura camerei timp de 5 minute și centrifugați scurt pentru a colecta tot lichidul.
6. Așezați benzile de 4 sau 8 eprubete pe un suport magnetic pentru format de plăci de 96 de godeuri timp de 3 minute sau până când lichidul devine transparent.
7. Eliminați cu grijă 150 μ l de supernatant folosind o pipetă multicanal.

Țineți eprubetele pe suportul magnetic pentru următorii pași.

8. Folosind o pipetă multicanal, adăugați 170 μ l de etanol 80% la bilele magnetice.
Lăsați eprubetele în repaus timp de 30 de secunde până la 1 minut.
9. Eliminați cu grijă etanolul cu ajutorul unei pipete multicanal.
10. Repetați o dată pașii 8 și 9.
11. Îndepărtați etanolul rezidual cu ajutorul unei pipete multicanal P10 sau P20.
12. Lăsați bilele magnetice să se usuce la aer la temperatura camerei timp de 4 minute. Nu uscați prea mult bilele magnetice deoarece acest lucru ar putea reduce cantitatea de ADN recuperat.

Scoateți eprubetele din suportul magnetic.

13. Folosind o pipetă multicanal, adăugați 20 μ l de IDTE la bilele magnetice. Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori și centrifugați scurt.

Continuați cu amplificarea bibliotecii.

4.2.7. Amplificarea bibliotecii

MATERIALE

- Produse de ligare cu selecție duală de dimensiune și bile magnetice resuspendate în 20 μ l de IDTE fiecare
- Preamestec PCR

PREGĂTIRE

Programați ciclul termic pentru amplificarea bibliotecii cu următoarele setări:



	TEMPERATURĂ (°C)	TIMP (SECUNDE)	
Capac	99	-	
Pasul 1: Denaturarea inițială	98	120	
Pasul 2: Denaturare	98	20	8 cicluri
Pasul 3: Aliniere	60	30	
Pasul 4: Extindere	72	30	
Pasul 5: Extindere finală	72	60	
Menținere	10	∞	

PROCEDURĂ

1. În funcție de numărul de probe, procedați după cum urmează:

- Dacă se procesează **4 probe**, treceți la pasul 2.
- Dacă se procesează **8 sau mai multe probe**, procedați după cum urmează:
 - a. Pentru a facilita pipetarea, creați un rezervor de preamestec PCR prin adăugarea următoarelor volume la un nou set de benzi cu 4 sau 8 eprubete, în conformitate cu următoarea schemă:

NUMĂRUL DE REACȚII	8	12	16	24	32	48
Bandă PCR (1 bandă)	4 eprubete	4 eprubete	8 eprubete	8 eprubete	8 eprubete	8 eprubete
Preamestec PCR (în μ l)	65	100	65	100	130	200

2. Pregătiți reacția după cum urmează:

- Dacă se procesează 8 sau mai multe probe, folosind o pipetă multicanal, adăugați 30 μ l de preamestec PCR la produsele de ligare cu selecție duală de dimensiune și la bilele magnetice (volum total 50 μ l = 30 μ l + 20 μ l).
- Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori și centrifugați scurt.

3. Introduceți eprubetele în ciclul termic și rulați programul de amplificare a bibliotecii.



Sfat: punct de oprire sigur peste noapte la 4 °C.



4.2.8. Curățarea după amplificare

MATERIALE

- Produse de reacție PCR în 50 µl fiecare
- Bile magnetice AMPure XP echilibrate la temperatura camerei
- Etanol 80% proaspăt preparat
- Apă fără conținut de nuclează
- Eprubete cu adsorbție redusă pentru ADN, pentru stocarea bibliotecilor

PROCEDURĂ

1. Folosind o pipetă multicanal, adăugați 50 µl de bile magnetice AMPure XP la fiecare 50 µl de produs PCR. Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori.
2. Incubați la temperatura camerei timp de 5 minute și centrifugați scurt pentru a colecta tot lichidul.
3. Așezați benzile de 4 sau 8 eprubete pe un suport magnetic pentru format de plăci de 96 de godeuri timp de 5 minute sau până când lichidul devine transparent.
4. Eliminați cu grijă 90 µl de supernatant folosind o pipetă multicanal.

Țineți eprubetele pe suportul magnetic pentru următorii pași.

5. Folosind o pipetă multicanal, adăugați 170 µl de etanol 80% la bilele magnetice.
Lăsați eprubetele în repaus timp de 30 de secunde până la 1 minut.
6. Eliminați cu grijă etanolul cu ajutorul unei pipete multicanal.
7. Repetați o dată pașii 5 și 6.
8. Îndepărtați etanolul rezidual cu ajutorul unei pipete multicanal P10 sau P20.
9. Lăsați bilele magnetice să se usuce la aer la temperatura camerei timp de 5 minute. Nu uscați prea mult bilele magnetice deoarece acest lucru ar putea reduce cantitatea de ADN recuperat.

Scoateți eprubetele din suportul magnetic.

10. Folosind o pipetă multicanal, adăugați 20 µl de apă fără conținut de nuclează la bilele magnetice. Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori. Incubați la temperatura camerei timp de 5 minute și centrifugați pentru a colecta tot lichidul.
11. Așezați banda de 4 sau 8 eprubete pe un suport magnetic pentru format de plăci de 96 de godeuri timp de 5 minute sau până când lichidul devine transparent.
12. Transferați cu grijă 18 µl de supernatant (se recomandă transferul de două ori a 9 µl în această etapă) într-o eprubetă nouă, etichetată, pentru depozitarea bibliotecii.



Sfat: punct de oprire sigur peste noapte la 4 °C sau -20 °C pentru depozitare mai lungă.



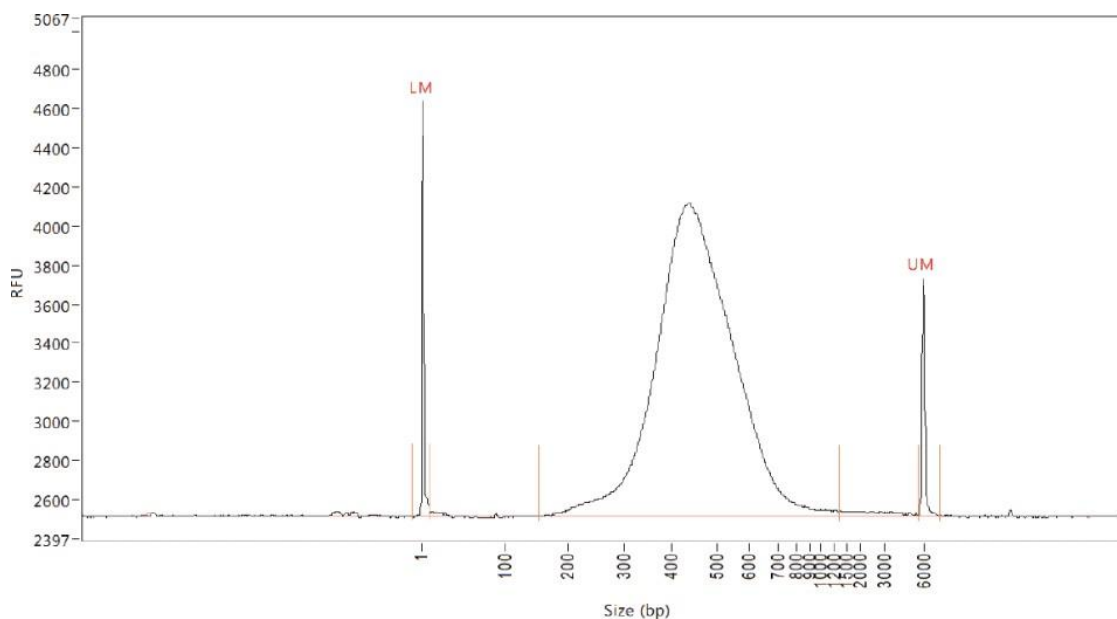
4.2.9. Cuantificarea bibliotecilor individuale și controlul calității

MATERIALE

- Echipamente și reactivi de cuantificare fluorometrică
- Sistem de electroforeză capilară
- Apă fără conținut de nuclează
- Benzi de 8 eprubete de 0,2 ml fără RNase/DNase

PROCEDURĂ

1. Preparați o diluție de 4 ori a fiecărei biblioteci cu apă fără nuclează (de exemplu, 2 μl de bibliotecă în 6 μl de apă fără nuclează).
2. Cuantificați bibliotecile cu ajutorul unei metode fluorometrice (de exemplu, cuantificare Qubit HS utilizând 2 μl din diluția 4x a bibliotecii menționată mai sus).
3. Efectuați controlul calității bibliotecilor prin analizarea profilului acestora prin electroforeză capilară. Fragmentele de ADN din bibliotecă trebuie să aibă o distribuție a dimensiunii între 300bp și 700bp.



Exemplu de distribuție a unei biblioteci de ADN obținută cu sistemul de electroforeză capilară Agilent Fragment Analyzer. UM - Marker superior, LM - Marker inferior



4.3. Captură

4.3.1. Gruparea bibliotecilor

MATERIALE

- Biblioteci individuale
- ADN Cot uman
- Blocanți universali - Amestec TS
- Eprubete de 1,5 ml cu adsorbție redusă pentru ADN

PROCEDURĂ

1. Pregătiți un preamestec din următoarele elemente într-o eprubetă cu adsorbție redusă pentru ADN

NUMĂR DE CAPTURI (Consultați tabelul de la punctul 3)	1	2	3	4
ADN Cot uman (în μ l)	5	11	16,5	22
Blocanți universali - Amestec TS (în μ l)	2	4,4	6,6	8,8

2. În cazul în care se efectuează două sau mai multe capturi, se pipetează 7 μ l din preamestecul de mai sus în eprubete individuale cu adsorbție redusă pentru ADN.
3. În eprubetele individuale care conțin preamestecul de mai sus, adăugați un grup de biblioteci individuale în conformitate cu formatul kitului:

FORMAT KIT	kit de 16 probe	kit de 32 de probe	kit de 48 de probe	kit de 96 de probe
Numărul de biblioteci individuale per captură	4	8	12	12
Cantitatea din fiecare bibliotecă per captură	300 ng	200 ng	150 ng	150 ng
Cantitatea totală de biblioteci per captură	1200 ng	1600 ng	1800 ng	1800 ng

4. Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori și centrifugați scurt.
5. Uscați fiecare amestec folosind un concentrator de ADN în vid până când amestecul este complet liofilizat. Utilizați încălzirea ușoară (45-50 °C) pentru a accelera liofilizarea.



Sfat: punct de oprire sigur peste noapte la -20 °C.

4.3.2. Hibridizarea

MATERIALE

- Biblioteci liofilizate
- 2x tampon de hibridizare
- Intensificator tampon de hibridizare
- Sonde Hereditary Cancer Solution
- Apă fără conținut de nuclează
- Benzi de 8 eprubete de 0,2 ml fără RNase/DNase
- Eprubete de 1,5 ml
- 10x tampon de spălare I
- 10x tampon de spălare II
- 10x tampon de spălare III
- 10x tampon de spălare stringentă
- 2x tampon de spălare bile magnetice

PREGĂTIRE

1. Preîncălziți ciclul termic la 95 °C (setați capacul la 99 °C).
2. După denaturarea de 10 minute, treceți direct la 65 °C (setați capacul la 75 °C).



Important: recomandăm utilizarea unor cicloare termice diferite pentru incubările la 95 °C și 65 °C, dacă sunt disponibile.

PROCEDURĂ

1. Pregătiți un preamestec de hibridizare în funcție de numărul de reacții de capturare:

NUMĂR DE CAPTURI	1	2	3	4
2x tampon de hibridizare (în µl)	8,5	18,7	28,05	37,4
Intensificator tampon de hibridizare (în µl)	3,4	7,48	11,22	14,96
Apă fără conținut de nuclează (în µl)	1,1	2,42	3,63	4,84

2. Resuspendați granula liofilizată în 13 µl de preamestec de hibridizare.
3. Transferați granula liofilizată într-o eprubetă PCR (o eprubetă pentru fiecare reacție de capturare).
4. Incubați în ciclul termic la 95 °C timp de 10 minute.



Important: Nu lăsați temperatura eprubetei să scadă sub 65 °C între pașii 3 și 5, deoarece acest lucru poate duce la o aliniere incorectă a sondelor.

5. Mutați eprubeta PCR de la ciclul termic setat la 95 °C la cel setat la 65 °C, apoi adăugați 4 µl de sonde la amestec. Folosind o pipetă setată la 13 µl, amestecați bine prin pipetări în sus și în jos de 5 ori.
6. Incubați în ciclul termic la 65 °C timp de 4 ore.
7. Pregătiți în prealabil 1x soluții de lucru ale diferitelorampoane de spălare, așa cum este descris în paginile următoare, pentru a le permite să ajungă la echilibru în timpul reacției de hibridizare.



PREGĂTIREA TAMPOANELOR DE SPĂLARE PENTRU 1 REACȚIE

TAMPON	TAMPON DE DEPOZITARE (μl)	APĂ (μl)	VOLUM FINAL 1X (μl)
10x tampon de spălare I	33	297	330
10x tampon de spălare II	22	198	220
10x Tampon de spălare III	22	198	220
10x tampon de spălare stringentă	44	396	440
2x tampon de spălare bile magnetice	275	275	550



Important: Preîncălziți 1x tampon stringent și alicotați 110 μl din 1x tampon de spălare I la 65 °C într-un termobloc sau într-o baie de apă timp de cel puțin 2 ore. Păstrați tamponul de spălare I rămas la temperatura camerei.

PREGĂTIREA TAMPOANELOR DE SPĂLARE PENTRU 2 REACȚII

TAMPON	TAMPON DE DEPOZITARE (μl)	APĂ (μl)	VOLUM FINAL 1X (μl)
10x tampon de spălare I	66	594	660
10x tampon de spălare II	44	396	440
10x Tampon de spălare III	44	396	440
10x tampon de spălare stringentă	88	792	880
2x tampon de spălare bile magnetice	550	550	1100



Important: Preîncălziți 1x tampon stringent și alicotați 220 μl din 1x tampon de spălare I la 65 °C într-un termobloc sau într-o baie de apă timp de cel puțin 2 ore. Păstrați tamponul de spălare I rămas la temperatura camerei.



PREGĂTIREA TAMPOANELOR DE SPĂLARE PENTRU 3 REACȚII

TAMPON	TAMPON DE DEPOZITARE (μl)	APĂ (μl)	VOLUM FINAL 1X (μl)
10x tampon de spălare I	99	891	990
10x tampon de spălare II	66	594	660
10x Tampon de spălare III	66	594	660
10x tampon de spălare stringentă	132	1188	1320
2x tampon de spălare bile magnetice	825	825	1650



Important: Preîncălziți 1x tampon stringent și alicotați 330 μl din 1x tampon de spălare I la 65 °C într-un termobloc sau într-o baie de apă timp de cel puțin 2 ore. Păstrați tamponul de spălare I rămas la temperatura camerei.

PREGĂTIREA TAMPOANELOR DE SPĂLARE PENTRU 3 REACȚII

TAMPON	TAMPON DE DEPOZITARE (μl)	APĂ (μl)	VOLUM FINAL 1X (μl)
10x tampon de spălare I	132	1188	1320
10x tampon de spălare II	88	792	880
10x Tampon de spălare III	88	792	880
10x tampon de spălare stringentă	176	1584	1760
2x tampon de spălare bile magnetice	1100	1100	2200



Important: Preîncălziți 1x tampon stringent și alicotați 440 μl din 1x tampon de spălare I la 65 °C într-un termobloc sau într-o baie de apă timp de cel puțin 2 ore. Păstrați tamponul de spălare I rămas la temperatura camerei.

4.3.3. Pregătirea bilelor magnetice de streptavidină

MATERIALE

- Bile magnetice de streptavidină echilibrate la temperatura camerei
- 1x tampon de spălare bile magnetice
- Eprubete de 1,5 ml
- Benzi de 8 eprubete de 0,2 ml fără RNase/DNase



PROCEDURĂ

Efectuați acești pași chiar înainte de încheierea incubării de hibridizare de 4 ore.

1. Amestecați bilele magnetice prin agitare cu vortex timp de 15 secunde.
2. Transferați 100 µl de bile magnetice pentru fiecare captură (200 µl pentru 2 reacții, 300 µl pentru 3 reacții, 400 µl pentru 4 reacții) într-o singură eprubetă de 1,5 ml.
3. Așezați eprubeta pe un suport magnetic și lăsați-o în repaus până când soluția devine transparentă. Îndepărtați cu grijă și eliminați supernatantul.
4. Adăugați 200 µl de 1x tampon de spălare a bilelor magnetice pentru fiecare captură (400 µl pentru 2 reacții, 600 µl pentru 3 reacții, 800 µl pentru 4 reacții) în eprubetă. Agitați cu vortex timp de 10 secunde.
5. Așezați eprubeta pe un suport magnetic și lăsați-o în repaus până când soluția devine transparentă. Îndepărtați cu grijă și eliminați supernatantul.
6. Repetați o dată pașii 4 și 5.
7. Adăugați 100 µl de 1x tampon de spălare a bilelor magnetice pentru fiecare captură (200 µl pentru 2 reacții, 300 µl pentru 3 reacții, 400 µl pentru 4 reacții) în eprubetă. Agitați cu vortex timp de 10 secunde.
8. Transferați 100 µl de bile magnetice curățate într-o nouă eprubetă PCR (o eprubetă pentru fiecare reacție de capturare).
9. Așezați eprubeta (eprubetele) pe un suport magnetic pentru format de plăci de 96 de godeuri și lăsați-o (lăsați-le) în repaus până când soluția devine transparentă. Îndepărtați cu grijă și eliminați supernatantul.



Important: Nu lăsați bilele magnetice să se usuce.

Continuați imediat cu legarea țintei hibridizate la bilele magnetice.

4.3.4. Legarea țintei hibridizate la bilele magnetice

MATERIALE

- Bile magnetice de Streptavidin curățate în eprubetă (eprubete) PCR
- Reacție (reacții) de hibridizare

PROCEDURĂ

Important: Lucrați rapid pentru a vă asigura că temperatura probei rămâne aproape de 65 °C.

1. Scoateți reacția (reacțiile) de hibridizare din ciclul termic, centrifugați scurt eprubeta (eprubetele) și puneți-le înapoi în ciclul termic.
2. Introduceți eprubetele cu bile magnetice de streptavidină spălate în ciclul termic (nu mai mult de două eprubete pe rând pentru a evita uscarea bilelor).



3. Pentru fiecare reacție de hibridizare, transferați 17 µl din soluția de reacție de hibridizare într-o eprubetă PCR care conține bile magnetice curățate. Resuspendați bilele magnetice prin pipetări în sus și în jos până când soluția este omogenă.
4. Legați ADN-ul de bilele magnetice prin introducerea eprubetei (eprubetelor) într-un ciclor termic setat la 65 °C (capacul la 75 °C). Incubați timp de 45 de minute.
5. În timpul incubării, pipetați ușor în sus și în jos eprubeta (eprubetele) la fiecare 15 minute pentru a vă asigura că bilele magnetice rămân în suspensie.

Continuați direct cu spălarea bilelor magnetice de streptavidină pentru a elimina ADN-ul nelegat.

4.3.5. Spălarea bilelor magnetice de streptavidină pentru a îndepărta ADN-ul nelegat

MATERIALE

- Ținte hibridizate pe bile magnetice
- Benzi de 8 eprubete de 0,2 ml fără RNase/DNase
- Eprubete de 1,5 ml cu adsorbție redusă pentru ADN
- 1x tampon de spălare I (1/3 la 65 °C și 2/3 la temperatura camerei)
- 1x tampon de spălare II
- 1x tampon de spălare III
- 1x tampon de spălare stringentă (la 65 °C)
- Apă fără conținut de nuclează
- IDTE

PROCEDURĂ



Important: asigurați-vă că temperatura rămâne aproape de 65 °C pentru pașii 1-7.

Notă: dacă lucrați cu 2 sau mai multe eprubete de captare, lucrați în mod eșalonat de la pasul 2 la pasul 8, inclusiv următoarele:

1. **Atunci când se amplasează prima eprubetă în termobloc la 65 °C pentru prima incubarea de 5 minute (etapa 5), porniți un cronometru.**
2. **Începeți procesarea celei de a doua eprubete.**
3. **Atunci când amplasați a doua eprubetă la 65 °C, observați timpul de separare a eprubetelor și asigurați-vă că respectați acest interval de timp de-a lungul etapelor 2-8 pentru a vă asigura că fiecare eprubetă incubează exact 5 minute la 65 °C cu spălarea stringentă.**

1. Adăugați 100 µl de 1x tampon de spălare I (la 65 °C) în fiecare dintre eprubetele cu țintă hibridizată/bile magnetice de streptavidină.
2. Lucrând câte cu o eprubetă pe rând, resuspendați și transferați amestecul unul câte unul într-o nouă eprubetă de 1,5 ml cu adsorbție redusă pentru ADN. Dacă lucrați cu două sau mai multe eprubete de captare, lucrați în mod eșalonat, după cum se indică mai sus.



3. Amplasați eprubeta pe un suport magnetic și lăsați-o să stea în repaus până când soluția devine transparentă. Îndepărtați cu grijă și eliminați supernatantul.
4. Adăugați 200 µl de 1x tampon de spălare stringentă (la 65 °C) în eprubetă.

Resuspendați ușor bilele magnetice prin pipetări în sus și în jos.

Amestecarea puternică a bilelor magnetice cu tamponul de spălare stringentă ar putea reduce calitatea capturii.

5. Incubați la 65 °C timp de 5 minute.
6. Amplasați eprubeta pe un suport magnetic și lăsați-o să stea în repaus până când soluția devine transparentă. Îndepărtați cu grijă și eliminați supernatantul.
7. Repetați o dată pașii de la 4 la 6.

Lucrați la temperatura camerei.

8. Adăugați 200 µl de 1x tampon de spălare I (la temperatura camerei) în eprubetă. Resuspendați ușor bilele magnetice prin pipetări în sus și în jos.

Notă: dacă lucrați cu 2 sau mai multe eprubete de captură; începând cu acest pas, procesați toate eprubetele în același timp.

9. Agitați cu vortex timp de 2 minute.
10. Așezați eprubeta (eprubetele) pe un suport magnetic și lăsați-o (lăsați-le) în repaus până când soluția devine transparentă. Îndepărtați cu grijă și eliminați supernatantul.
11. Adăugați 200 µl de 1x tampon de spălare II în fiecare eprubetă. Agitați cu vortex timp de 1 minute.
12. Așezați eprubeta (eprubetele) pe un suport magnetic și lăsați-o (lăsați-le) în repaus până când soluția devine transparentă. Îndepărtați cu grijă și eliminați supernatantul.
13. Adăugați 200 µl de 1x tampon de spălare III în fiecare eprubetă. Agitați cu vortex timp de 30 de secunde. Centrifugați scurt pentru a colecta tot lichidul.
14. Așezați eprubeta (eprubetele) pe un suport magnetic și lăsați-le în repaus până când soluția devine transparentă. Îndepărtați cu grijă și eliminați supernatantul.
15. Adăugați 200 µl de 1x IDTE în fiecare eprubetă. Resuspendați bilele magnetice. Centrifugați scurt pentru a colecta tot lichidul.
16. Așezați eprubeta (eprubetele) pe un suport magnetic și lăsați-o (lăsați-le) în repaus până când soluția devine transparentă. Îndepărtați cu grijă și eliminați supernatantul.
17. Eliminați tot lichidul rămas folosind o pipetă P10 sau P20.
18. Adăugați 20 µl de apă fără conținut de nuclează în fiecare eprubetă, resuspendați și transferați amestecul de bile magnetice/apă într-o nouă eprubetă PCR.



4.3.6. Amplificarea post-captură

MATERIALE

- Suspensie de bile magnetice de streptavidină/apă fără conținut de nuclează (20 μ l)
- 2x KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix
- 10x amestec de primer pentru amplificarea bibliotecii
- Apă fără conținut de nuclează

PREGĂTIRE

Programați ciclul termic pentru amplificarea post-captură utilizând următoarele setări:

	TEMPERATURĂ (°C)	TIMP (SECUNDE)	
Capac	99	-	14 cicluri
Pasul 1: Denaturarea inițială	98	45	
Pasul 2: Denaturare	98	15	
Pasul 3: Aliniere	60	30	
Pasul 4: Extindere	72	30	
Pasul 5: Extindere finală	72	60	
Menținere	10	∞	

PROCEDURĂ

1. Pregătiți preamestecul PCR după cum urmează:

PREAMESTEC PCR				
Număr de reacții	1	2	3	4
2x KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix (în μ l)	25	55	82,5	110
10x amestec de primer pentru amplificarea bibliotecii (în μ l)	2,5	5,5	8,25	11
Apă fără conținut de nuclează (în μ l)	2,5	5,5	8,25	11



2. Adăugați 30 μl de preamestec PCR la fiecare suspensie de bile magnetice. Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori și centrifugați scurt.
3. Introduceți eprubeta (eprubetele) în ciclul termic și rulați programul post captură de amplificare a bibliotecii.



Sfat: punct de oprire sigur peste noapte la 4 °C sau -20 °C pentru depozitare mai lungă.

4.3.7. Curățarea amplificării post-captură

MATERIALE

- Produse de reacție PCR în 50 μl fiecare
- Bile magnetice AMPure® XP echilibrate la temperatura camerei
- Etanol 80% proaspăt preparat
- IDTE
- Eprubete cu adsorbție redusă pentru ADN pentru depozitarea bibliotecii.

PROCEDURĂ

1. Adăugați 50 μl de bile magnetice AMPure® XP la fiecare dintre produsele de reacție PCR de 50 μl. Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori.
2. Incubați la temperatura camerei timp de 5 minute și centrifugați scurt pentru a colecta tot lichidul.
3. Așezați eprubeta (eprubetele) pe un suport magnetic timp de 5 minute sau până când lichidul devine transparent.
4. Eliminați cu grijă 90 μl de supernatant folosind o pipetă multicanal.

Țineți eprubeta (eprubetele) pe suportul magnetic pentru următorii pași.

5. Folosind o pipetă multicanal, adăugați 170 μl de etanol 80% la bilele magnetice. Lăsați eprubetele în repaus timp de 30 de secunde până la 1 minut.
6. Eliminați cu grijă etanolul.
7. Repetați o dată pașii 5 și 6.
8. Îndepărtați etanolul rezidual cu ajutorul unei pipete P10 sau P20.
9. Lăsați bilele magnetice să se usuce la aer la temperatura camerei timp de 5 minute. Nu uscați prea mult bilele magnetice deoarece acest lucru ar putea reduce cantitatea de ADN recuperat.

Scoateți eprubeta (eprubetele) din suportul magnetic.

10. Adăugați 20 μl de IDTE la bilele magnetice. Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori. Incubați la temperatura camerei timp de 5 minute și centrifugați scurt pentru a colecta tot lichidul.
11. Așezați eprubeta (eprubetele) pe un suport magnetic timp de 5 minute sau până când lichidul devine transparent.



- Transferați cu grijă 18 μ l de supernatant (se recomandă transferul de două ori a 9 μ l în această etapă) într-o eprubetă nouă, etichetată, pentru depozitarea bibliotecii.



Sfat: punct de oprire sigur peste noapte la 4 °C sau -20 °C pentru depozitare mai lungă.

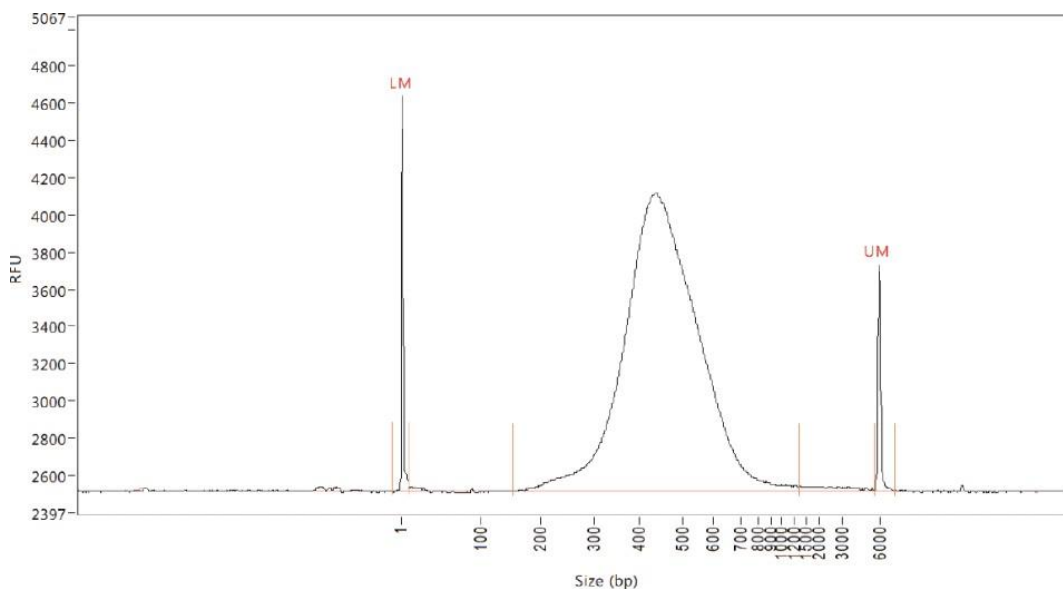
4.3.8. Cuantificarea finală a bibliotecii și controlul calității

MATERIALE

- Echipe și reactivi de cuantificare fluorometrică
- Sistem de electroforeză capilară

PROCEDURĂ

- Cuantificați fiecare grup de bibliotecă capturat cu o metodă fluorometrică (de exemplu, cuantificarea Qubit HS folosind 2 μ l din bibliotecă).
- Controlați calitatea grupului de bibliotecă prin analizarea profilului acestora prin electroforeză capilară. Fragmentele de ADN din bibliotecă trebuie să aibă o distribuție a dimensiunii între 300bp și 700bp.



Exemplu de distribuție a dimensiunii grupului de bibliotecă capturate, obținută cu sistemul de electroforeză capilară Agilent Fragment Analyzer. UM-Marker superior, LM-Marker inferior



4.4. Secvențierea

4.4.1. Pregătirea bibliotecii pentru secvențiere

MATERIALE

- Kit de reactivi Illumina MiSeq® v3
- Biblioteci finale capturate
- Tampon EBT sau similar

PROCEDURĂ

1. Determinați molaritatea fiecărui grup cu dimensiunea medie a bibliotecii (dimensiunea vârfului în perechi de baze) și concentrația (ng/μl) obținute în etapa 5.3.8, după cum urmează:

$$\text{Molaritatea bibliotecii (nM)} = \frac{\text{Concentrația bibliotecii (ng/}\mu\text{L)}}{\text{Dimensiune medie (perechi de baze)} \times 649,5} \times 10^6$$

2. Diluați fiecare grup la 4 nM și amestecați în cantități egale (de exemplu, 5 μl din fiecare). Amestecați bine și utilizați
această diluție în conformitate cu recomandările Illumina® privind denaturarea standard.
3. Încărcați o diluție de 10 pM a bibliotecilor denaturate pe MiSeq®.
4. Citirile minime recomandate sunt de 1,0 milioane de citiri per probă, cu o lungime de citire de 300 bp.

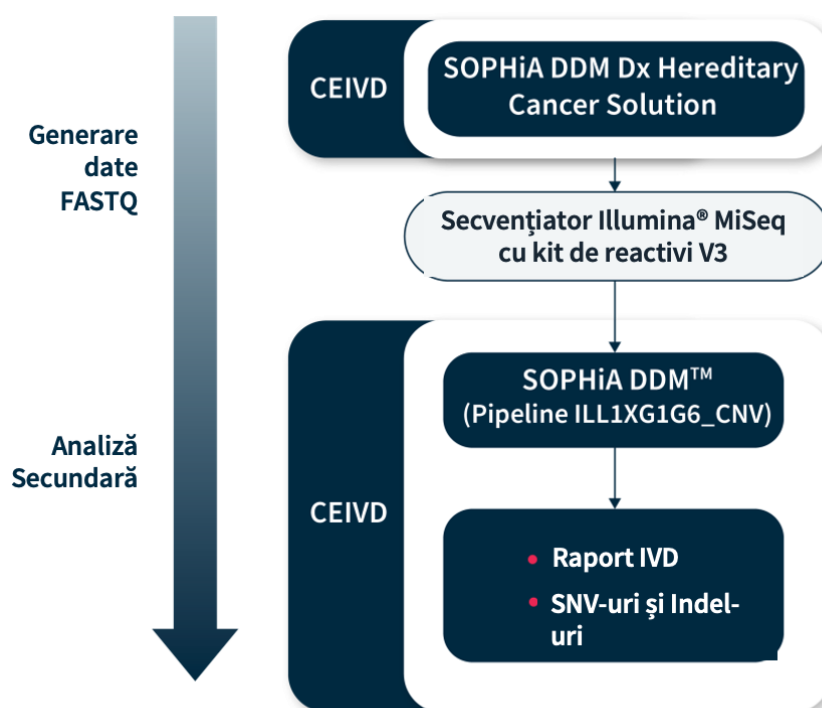


5. PROCEDURA DE ANALIZĂ

5.1. Instrucțiuni de instalare a modului SOPHiA DDM™ Dx

Nu este necesară nicio instalare pentru utilizarea modului SOPHiA DDM™ Dx. Va fi trimis un e-mail cu instrucțiuni și un link pentru modul SOPHiA DDM™ Dx. Vă rugăm să consultați Manualul de utilizare al modului SOPHiA DDM™ Dx pentru informații privind gestionarea contului, compatibilitatea cu browserele și alte notificări importante. Documentele de asistență sunt disponibile, de asemenea, direct prin modul SOPHiA DDM™ Dx.

5.2. Descrierea fluxului de lucru de analiză pentru generarea rezultatelor IVD



Descrierea fluxului de lucru pentru analiza SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution

Vă rugăm să consultați Manualul de utilizare al modului SOPHiA DDM™ Dx pentru descrierea completă a fluxului de încărcare.



6. LIMITĂRI, AVERTISMENTE ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

AVERTISMENTE GENERALE

- Pentru instrucțiuni detaliate privind software-ul, consultați manualul de utilizare al modului SOPHiA DDM™ Dx.
- Dacă se modifică orice parte a manipulării, protocolului, secvențiatorului, multiplexării etc., analizele nu sunt acoperite de instrucțiunile de utilizare descrise.
- Datele furnizate în Raportul de calitate (disponibil pentru descărcare de pe Platforma modului SOPHiA DDM™ Dx) sunt doar cu titlu informativ și nu sunt destinate a fi utilizate pentru diagnosticare.
- Acuratețea rezultatelor analizei nu poate fi garantată. Laboratoarele de secvențiere trebuie să efectueze verificări ale calității probelor și să semnaleze probele neconforme. Probele neconforme (de exemplu, proba de biopsie insuficientă) ar putea duce la rezultate compromise. SOPHiA GENETICS nu este răspunzătoare pentru rezultatele obținute și pentru deciziile luate pe baza acestor rezultate.
- Respectarea bunelor practici de laborator, precum și urmarea strictă a instrucțiunilor de utilizare (IFU), sunt necesare pentru a obține performanța corespunzătoare a produsului. Pentru informații specifice privind siguranța, consultați fișele cu date privind siguranța materialelor (MSDS) corespunzătoare, furnizate împreună cu fiecare componentă a produsului.
- Pentru a preveni contaminarea probelor de ADN, trebuie definite spații separate fizic pentru etapele pre- și post-PCR. Utilizați întotdeauna reactivi proaspeți, ADN corect extras și depozitat. Pentru detalii privind calitatea și integritatea ADN-ului, consultați Secțiunea 5 a IFU. Materiale și metode pentru kit - Secțiunea 5.2.1 Prepararea ADN-ului genomic.
- Pentru efectuarea experimentului, trebuie utilizate pipete corect calibrate și echipamente de laborator adecvate.
- Nu trebuie amestecate loturi diferite de reactivi.
- Deciziile privind îngrijirea și tratamentul pacientului trebuie să se bazeze pe judecata medicală independentă a medicului curant, luând în considerare toate informațiile aplicabile privind starea pacientului, cum ar fi istoricul pacientului și al familiei, examinările fizice, informațiile obținute în urma altor teste de diagnosticare și preferințele pacientului, în conformitate cu standardul de îngrijire într-o anumită comunitate.

LIMITĂRI GENERALE

- Calitatea necorespunzătoare a datelor, cauzată de probleme în etapa de pregătire a probelor sau de secvențiere, poate afecta analiza datelor și poate conduce la rezultate fals pozitive și/sau fals negative.
- Absența unei variante în raport nu exclude prezența unei variante sub limita de detecție a testului.
- Interferența între probe (crosstalk), cauzată de index-hopping, poate conduce la rezultate fals pozitive în identificarea variantelor. În majoritatea cazurilor, acestea vor fi detectate cu o fracție a variantei scăzută



(0,1–2%) și, prin urmare, vor fi filtrate ca variante cu încredere redusă. Următorii factori pot agrava interferența între probe din cauza index-hoppingului și pot conduce la fracții de variante mai mari:

- Acoperire foarte mare în una sau câteva probe din cauza unor probleme în timpul cuantificării/normalizării probelor sau a amplificării genelor la nivel înalt.

SNV / INDELS

- Detectarea variantelor în acest produs a fost optimizată pentru detectarea SNV-urilor și a INDEL-urilor scurte (până la 2/3 din lungimea citirii). Vă rugăm să rețineți că orice alt tip de alterare poate fi omis de algoritm.
 1. Fuziunile genice sau inversiunile nu pot fi detectate.
 2. Delețiile sau inserțiile cu un punct de rupere în afara regiunii țintă ar putea să nu fie detectate.
 3. Delețiile mari, cu o lungime mai mare de aproximativ 5.000 bp, s-ar putea să nu fie mapate corect și ar putea fi omise.
 4. Inserțiile mari, cu o lungime mai mare de aproximativ 2/3 din lungimea citirii pot fi omise din cauza lungimii insuficiente a ancorei pentru identificarea locului de inserție.
 5. Duplicațiile care nu sunt acoperite integral de citiri complete (inclusiv secvența de referință care este duplicată) ar putea fi omise.
 6. În cazul unei duplicații în tandem cu o lungime mai mare de 1/3 din lungimea citită, numărul exact de repetări în tandem nu poate fi determinat.
 7. Inserțiile Alu mai lungi de 2/3 din lungimea citirii pot fi detectate dacă se potrivesc cu cel puțin o secvență dintr-o bază de date cu secvențe Alu cunoscute. În caz contrar, acestea vor fi omise.
 8. Cuantificarea inserțiilor mai lungi decât lungimea citirii poate crește riscul de supraestimare a fracțiilor de variante.
- Detectarea variantelor în acest produs a fost optimizată pe regiunile definite ca „regiuni țintă”. Vă rugăm să rețineți că regiunile din afara acestei definiții pot prezenta rezultate fals negative și/sau fals pozitive.
- Pentru o performanță stabilă a analizei datelor, recomandăm o acoperire de cel puțin 200x. Se recomandă o acoperire minimă de 50x pentru o identificare fiabilă a variantelor. Variantele pot fi omise în regiunile care prezintă o acoperire mai redusă.
- Variantele pot fi omise sau identificate greșit din cauza limitărilor în proiectarea kitului.
- Variantele din regiunile pentru care fragmentul relevant de ADN nu este extras de sonde nu pot fi detectate de produs. Variantele de capturare pot fi limitate de:
 1. INDEL-uri care afectează hibridizarea sondelor. Acest lucru poate duce la absența detectării sau la estimarea incorectă a fracției variantelor.
 2. Prezența mutației (mutațiilor) suplimentare în regiunea țintă a sondei pe aceeași alelă.



- SNV-urile sau INDEL-urile din homopolimeri cu lungimea de zece sau mai mare nu pot fi identificate cu încredere, deoarece detectarea lor este afectată de un nivel ridicat de zgomot de fond.
- Delin-urile complexe pot fi raportate ca variante multiple în cazul în care, în aliniere, acestea sunt reprezentate ca mai multe variante mai mici, separate de mai mult de 2 nucleotide.
- Regiunile problematice din Anexa 4 sunt anumite regiuni intronice din cadrul țintei și ar putea cauza unele incertitudini în detectarea variantelor. Acest lucru ar putea fi legat de tehnologia de secvențiere. O variantă detectată în această regiune va fi desemnată ca „scăzută (Low)” în tabelul de încredere din SOPHiA DDM™.
- Regiunile marcate în Anexa 4 prezintă caracteristici care fac ca detectarea variantelor să nu fie fiabilă. Acestea sunt raportate cu avertismente în interfața SOPHiA DDM™, iar variantele detectate în aceste regiuni sunt raportate cu un marcaj.
- Regiunile cu omologie ridicată a secvenței pot provoca incertitudini în mapare și pot duce la riscul de a omite variante sau de a le identifica eronat.
- Variantele pot fi reprezentate în diferite forme într-o anumită regiune. Dacă o variantă este reprezentată în două moduri diferite în cadrul citirilor aliniate sau este parțial nealiniată în unele citiri, fracția variantei poate fi subestimată sau varianta poate fi omisă din cauza fracției variantei scăzute.
- În cazul unor inserții/duplicații multiple prezente în aceeași regiune, este posibil ca nu toate să fie raportate corect. În special, atunci când o inserție mai mică este complet inclusă într-o inserție mai mare, este posibil să nu existe citiri care să identifice în mod unic inserția mai mică și aceasta ar putea fi omisă și raportată doar inserția mai mare.
- În cazul unor inserții/duplicații multiple prezente în aceeași regiune, este posibil ca nu toate să fie cuantificate corect. În special, atunci când o inserție mai mică este complet inclusă într-o inserție mai mare, este posibil să nu existe citiri care să identifice în mod unic inserția mai mică, iar fracția variantei raportate pentru inserția mai mică ar putea fi subestimată, în timp ce fracția variantei pentru inserția mai mare ar putea fi supraestimată.
- Prezența mozaicismului genetic la pacient ar putea conduce la o interpretare inexactă a rezultatelor.



7. EVALUAREA PERFORMANȚELOR NECLINICE

7.1. CARACTERISTICI DE PERFORMANȚĂ ANALITICĂ

Următorul studiu este împărțit în două părți. Prima parte descrie studiul de evaluare a performanței realizat pentru SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0 și Kitul de amplificare a bibliotecii KAPA™. A doua parte conține studiul de neregresie între SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0 și v1.1 utilizând kitul de amplificare a bibliotecii KAPA™ sau kitul SOPHiA GENETICS DNA Library Prep I Kit. Această ultimă parte include informații despre gena APC inclusă în SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1.

7.2. METODE

Informații generale

În acest studiu, performanța kitului SOPHiA DDM™ Dx HCS și a pipeline-ului SOPHiA DDM™ Dx ILL1XG1G6_CNV a fost evaluată cu date generate pe un instrument Illumina MiSeq® utilizând testul SOPHiA DDM™ Dx HCS. Au fost aplicate filtrele implicite legate de acoperire scăzută (prag de 50X), fracția variantei (prag de 20% pentru SNV și 15% pentru INDEL) și lungimea regiunii homopolimerice (prag de 10 bp). Pentru fiecare probă, variantele detectate de pipeline au fost comparate cu variantele confirmate „gold standard” furnizate de fiecare centru de secvențiere. Orice variante detectate în afara regiunilor țintă nu au fost luate în considerare.

Deoarece panoul SOPHiA DDM™ Dx HCS se referă la detectarea variantelor germinale, evaluările limitei de detecție (LOD) nu au fost necesare, deoarece fracțiile variantelor preconizate sunt semnificativ mai mari decât nivelurile posibile ale zgomotului de secvențiere.

Definiții ale sensibilității, specificității, acurateței, preciziei, repetabilității și reproductibilității

Fiecare poziție care a fost analizată atât prin metoda de referință, cât și prin metoda care combină utilizarea instrumentului MiSeq® și a panoului SOPHiA DDM™ Dx HCS a fost luată în considerare pentru a calcula parametrii de performanță analitică, cum ar fi sensibilitatea, specificitatea, acuratețea, precizia și consecvența.

Pentru toate pozițiile acoperite de panoul SOPHiA DDM™ Dx HCS și pentru care au fost disponibile informații de referință, au fost determinate numerele din următoarele categorii: Rezultatele pozitive adevărate (TP) și rezultatele negative adevărate (TN) sunt prezente în ambele seturi, rezultatele pozitive false (FP) sunt prezente doar în variantele detectate de SOPHiA DDM™ Dx, iar rezultatele negative false (FN) sunt prezente doar în tabelul cu variante confirmate. Toate pozițiile analizate (TP+FP+TN+FN) au fost determinate prin scăderea pozițiilor nedeterminate din regiunea țintă:

Regiunea țintă a panoului SOPHiA DDM™ Dx HCS: $CDS \pm 25bp$ (a se vedea Anexa 4 pentru lista completă a regiunilor țintă, precum și regiunile problematice și marcate aplicabile).

Regiuni nedefinite: Regiuni cu acoperire <50x

Regiuni problematice identificate sau regiuni cu pseudogene, astfel cum se specifică în documentația noastră pentru pipeline-ul SOPHiA DDM™ Dx HCS (Anexa 4).

În plus, INDEL-urile situate în regiuni homopolimerice mai mari de 9 bp au fost excluse din calcule.



Toți parametrii au fost calculați cu următoarele formule:

1. **Sensibilitatea** a fost determinată ca procent de variante confirmate detectate:

$$\textbf{Sensibilitate} = \frac{TP}{TP + FN} \times 100$$

2. **Specificitatea** a fost determinată ca procent de poziții negative care au fost identificate corect ca fiind negative:

$$\textbf{Specificitate} = \frac{TN}{TN + FP} \times 100$$

(cu TN= toate pozițiile analizate-TP-FP-FN)

3. **Acuratețea** a fost determinată ca procent de identificări corecte (pozitive și negative):

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

4. **Precizia** a fost determinată ca procent de identificări pozitive corecte din totalul identificărilor pozitive:

$$\textbf{Precizie} = \frac{TP}{TP + FP} \times 100$$

5. **Repetabilitatea secvențierii** a fost determinată, pentru fiecare pereche de replici intra-run A și B, ca procentul de baze bine definite (SP) din ambele probe dintre bazele care au fost bine definite în cel puțin una dintre probe. Bazele sunt considerate bine definite dacă sunt acoperite suficient și nu conțin detectări de variante cu încredere scăzută.

$$\textbf{Repetabilitatea secvențierii} = \frac{\sum_{i \in [SP_A \cap SP_B]} 1}{\sum_{i \in [SP_A \cup SP_B]} 1}$$

6. **Repetabilitatea variantei** - toate pozițiile care au fost bine definite în ambele replici sunt luate în considerare pentru a calcula fracția de baze care sunt identice în ambele replici. Pentru replicile intra-run A și B, cu poziții bine definite SPA și SPB, SPA[i] și SPB[i] reprezintă statusul variantei la poziția i. dx fiind operatorul care returnează 1 când x = 0 și 0 când x ≠ 0, repetabilitatea variantelor este definită ca:

$$\textbf{Repetabilitatea variantelor} = \frac{\sum_{i \in [SP_A \cap SP_B]} \delta_{SP_A[i] - SP_B[i]}}{\sum_{i \in [SP_A \cap SP_B]} 1}$$

7. **Repetabilitatea** a fost definită ca produsul celor două măsuri de mai sus:

$$\textbf{Repetabilitate} = \textbf{Repetabilitatea variantelor} \times \textbf{Repetabilitatea secvențierii} \times 100$$



8. **Reproductibilitatea** a fost definită în mod echivalent cu repetabilitatea (a se vedea formulele (5)-(7)) pentru replicile A și B inter-run.

TP, FP, TN și FN au fost calculate prin însumarea tuturor probelor din fiecare rulare. Sensibilitatea, specificitatea, acuratețea și precizia au fost calculate pe baza numărului total, conform formulelor menționate mai sus. Specificitatea, acuratețea și precizia au fost calculate numai cu ajutorul probelor complet caracterizate, din cauza lipsei pozițiilor True Negative în probele parțial caracterizate. Repetabilitatea și reproductibilitatea au fost calculate folosind toate pozițiile pentru toate probele și toate rulările luate în considerare.

Pentru a determina intervalele de încredere în cazul unei sensibilități de 100% sau al altor măsuri, au fost utilizate metodele descrise de Mattocks et al (2010) (Mattocks CJ et al, EuroGentest Validation Group, 2010). În cazurile în care criteriul măsurat a fost mai mic de 100%, s-a utilizat metoda exactă (Clopper, et al 1934) pentru a obține intervalul de încredere privind probabilitatea binomială pentru sensibilitate, specificitate, acuratețe și precizie (Clopper C et al, Biometrika, 1934). Pentru a reflecta diversitatea reală a variantelor, doar TP, FP, FN și TN unice au fost utilizate în calculele intervalului de încredere.

7.3. DATE (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)

Probele disponibile au fost grupate în două categorii, în funcție de gradul ridicat de încredere al caracterizării disponibile pentru comparațiile de referință. În primul rând, probele parțial caracterizate în care au fost identificate variante cunoscute cu grad ridicat de încredere au fost procesate fie de SOPHiA GENETICS (Site A), fie de parteneri externi (Site B - G). Aceste rezultate conțin o gamă largă de cazuri clinice reprezentative și permit estimări ale sensibilității pentru detectarea variantelor. În plus, au fost incluse replici pentru a estima repetabilitatea și reproductibilitatea.

A doua categorie de probe constă în probe de referință și clinice în care porțiuni extinse din regiunile țintă ale SOPHiA DDM™ Dx HCS au fost analizate fie cu un flux de diagnostic marcat CE-IVD, SOPHiA DDM™ Dx—BRCA—MASTR Dx—GL—MiSeq, fie în cadrul a cel puțin două experimente NGS separate, în care sunt luate în considerare doar pozițiile de consens.

7.4. CONCLUZII GENERALE (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)

Tabelul următor compilează rezumatele complete ale variantelor detectate în comparație cu lista de variante confirmate (TP/FN) pentru fiecare rulare care conține probe parțial caracterizate.

Tabelul 2. Rezumate ale variantelor pentru fiecare rulare a probelor parțial caracterizate.

Rulare	# Probe	TP	FN
SiteA_01	22	343	0
SiteA_02	10	11	0
SiteA_03	11	124	0
SiteA_04	5	5	0
SiteB_01	12	27	0
SiteB_02	8	9	0



Rulare	# Probe	TP	FN
SiteC_01	12	115	0
SiteC_02	12	72	0
SiteD	13	28	0
SiteE	9	57	0
SiteF	18	286	0
SiteG	27	180	0
Total	159	1257	0

Următorul tabel 3 compilează rezumatele complete ale variantelor detectate în comparație cu lista de variante confirmate (TP/FN/FP) și pozițiile de bază fără variante (TN) pentru fiecare rulare de probe complet caracterizate.

Tabelul 3. Rezumate ale variantelor pentru fiecare rulare a probelor complet caracterizate

Rulare	# Probe	TP	FN	PF	TN
Rulare A	24	665	0	0	1515530
Rulare B	24	329	0	2	583462
Rulare C	11	439	0	0	980668
Total	59	1433	0	2	3079660

Tabelul de mai jos prezintă pozițiile de bază TN unice și variantele detectate în acest studiu de evaluare a performanței. Numărul total de poziții de bază în regiunile analizate a fost de 90754 baze. Trei sute șaptezeci și trei (373) de variante unice au fost detectate în cadrul studiului. Rezultatele negative adevărate au fost combinate pentru toate probele pentru care erau disponibile date de referință cu grad ridicat de încredere și au acoperit un total de 90 623 de poziții.

Tabelul 4. Rezumate ale variantelor în toate rulările

TP	373
PF	2
FN	0
TN	90623



7.5. REZULTATE (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)

Combinăția dintre instrumentul Illumina MiSeq®, testul SOPHiA DDM™ Dx HCS și SOPHiA DDM™ conduce la o performanță observată de 100% sensibilitate, 99,99% specificitate, 99,99% acuratețe, 99,86% precizie, 99,983% repetabilitate și 99,93% reproductibilitate.

Tabelul 5. Rezumatul performanței

Nr.	Măsurarea performanței	Medie	Percentila a 5-a
A	Rata pe țintă	79,39%	[59,23%]
B	Uniformitate	99,72%	[98,24%]

Nr.	Măsurarea performanței	Observate	[limita inferioară a CI de 95%]*
1	Sensibilitate	100%	[99,20%]
2	Specificitate	99,99%	[99,99%]
3	Acuratețe	99,99%	[99,99%]
4	Precizie	99,86%	[96,42%]
5	Repetabilitate	99,98%	[99,98%]
6	Reproductibilitate	99,93%	[99,92%]

* CI 95% au fost calculate pe baza variantelor unice din studiul de evaluare a performanței pentru a reflecta diversitatea reală a variantelor.

** CI 95% au fost calculate pe toate pozițiile pentru toate probele. Repetabilitatea și reproductibilitatea se bazează pe replici.

7.6. STUDIU DE CORELARE DE TIP BRIDGING (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1)

SOPHiA GENETICS HCS v1.0 a fost testat anterior în detaliu pe o gamă largă de variante confirmate și utilizând probe bine caracterizate. Am procesat aceleași probe utilizând kituri diferite (SOPHiA GENETICS HCS v1.0 și SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1) și reactivi de pregătire a bibliotecilor KAPA™ Library Preparation Kit (KAPA™) sau Qiaseq® FX DNA Library Kit (Qiagen®) pentru a stabili că:

- Performanțele obținute utilizând kitul SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 și pregătirea bibliotecii KAPA™ sunt egale cu performanțele obținute utilizând kitul SOPHiA GENETICS HCS v1.0 și pregătirea bibliotecii KAPA™.
- Performanța obținute utilizând kitul SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 și pregătirea bibliotecii Qiagen este, de asemenea, la același nivel cu SOPHiA GENETICS HCS v1.0 și pregătirea bibliotecii KAPA™.
- Performanța analitică în noile regiuni vizate de SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 (APC CDS+ - 25bp) este ridicată.



Tabelul 6: Rezumat al performanței – comparație între kituri

Nr.	Măsurarea performanței	Observate	[limita inferioară a CI de 95%]**
1	Reproductibilitate KAPA™ v1.1 versus KAPA™ v1.0 (3 rulări pe 59 de probe)	99,99%	[99,99%]
2	Reproductibilitate Qiagen® v1.1 versus KAPA™ v1.0 (3 rulări pe 23 de probe)	99,99%	[99,99%]
3	Reproductibilitate KAPA™ (2 rulări pe 24 de probe)	99,95%	[99,95%]
4	Reproductibilitate Qiagen® (2 rulări pe 23 de probe)	99,99%	[99,99%]
5	Reproductibilitate KAPA™-Qiagen® (2 rulări pe 23 de probe)	99,99%	[99,99%]
















** CI 95% au fost calculate pe toate pozițiile pentru toate probele. Reproducibilitatea se bazează pe replici.

7.7. CONCLUZII

Pe baza datelor analizate intern, kitul SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 a obținut performanțe similare cu cele ale kitului precedent SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0 în ceea ce privește ratele pe țintă, regiunile acoperite, uniformitatea și detectarea variantelor, atât cu kiturile de pregătire a bibliotecilor KAPA™, cât și Qiagen®. Pentru noile regiuni care vizează gena APC, combinația dintre instrumentul Illumina MiSeq®, testul SOPHiA DDM™ Dx HCS și SOPHiA DDM™ conduce la o performanță observată de 100% sensibilitate, 100% specificitate, 100% acuratețe, 100% precizie. Reproducibilitatea generală utilizând fie kiturile de pregătire a bibliotecilor KAPA™, fie Qiagen® a fost mai mare de 99,9%.



8. SIMBOLURI

Simbol	Titlul
	Consultați instrucțiunile de utilizare
	Număr de catalog
	Codul lotului (numărul lotului)
	Atenție
	Producător
	Limita de temperatură
	Data limită de consum
	Conformitate europeană
	Reprezentant autorizat în Comunitatea Europeană
	Dispozitiv medical de diagnostic in vitro
	Conține suficient pentru <n> teste
	Importator
	Data de fabricație
	Consultați Avertismente și măsuri de precauție în „Secțiunea 5. Materiale și metode pentru kit”
	Consultați Avertismente și măsuri de precauție în „Secțiunea 5. Materiale și metode pentru kit”



9. ASISTENȚĂ

În cazul în care întâmpinați dificultăți în utilizarea modului SOPHiA DDM™ Dx, consultați secțiunea de depanare din Manualul de utilizare al modului SOPHiA DDM™ Dx disponibil pe SOPHiA DDM™ Dx sau contactați linia noastră de asistență la numărul de telefon +41 21 694 10 60 sau prin e-mail la support@sophigenetics.com. Vă rugăm să accesați www.sophigenetics.com pentru mai multe detalii. Asistența poate fi, de asemenea, accesată prin solicitare web din ecranul Tablou de bord în secțiunea Asistență a modului SOPHiA DDM™ Dx.

ANEXA 1. PLĂCI ADAPTOARE CU INDEX DUBLU

32 de adaptoare cu index dublu compatibile Illumina® în format de plăci de 96 de godeuri (7 µl fiecare)

	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 de adaptoare cu index dublu compatibile Illumina® în format de plăci de 96 de godeuri (7 µl fiecare)

	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 de adaptoare cu index dublu compatibile Illumina® în format de plăci de 96 de godeuri (7 µl fiecare)

	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	Secvențe i5 pentru foaia de eșantioane (sample sheet)
D501	TATAGCCT
D502	ATAGAGGC
D503	CCTATCCT
D504	GGCTCTGA
D505	AGGCGAAG
D506	TAATCTTA
D507	CAGGACGT
D508	GTACTGAC

i7	Secvențe i7 pentru foaia de eșantioane (sample sheet)
D701	ATTAECTCG
D702	TCCGGAGA
D703	CGCTCATT
D704	GAGATTCC
D705	ATTCAGAA
D706	GAATTCGT
D707	CTGAAGCT
D708	TAATGCGC
D709	CGGCTATG
D710	TCCGCGAA
D711	TCTCGCGC
D712	AGCGATAG



ANEXA 2. ECHIPAMENTE DE LABORATOR UTILIZATE ÎN LABORATORUL SOPHIA GENETICS

MATERIALE FURNIZATE DE UTILIZATOR	FURNIZOR	DENUMIREA PRODUSULUI	NR. CATALOG
Benzi de 8 eprubete fără RNase/DNase (0,2 ml)	Thermo Fisher Scientific	Eprubete EasyStrip Snap	AB-2000
Eprubete cu adsorbție redusă pentru ADN (1,5 ml)	Axygen	Eprubete microcentrifuge MaxyClear	MCT-175-C
Eprubete (1,5 ml)	Eppendorf	Eprubete Eppendorf	3810X
Eprubete conice (15 ml și 50 ml)	Falcon	Eprubete conice de centrifugare de 15 ml și 50 ml	352096 & 352070
Vârfuri de pipetă cu filtru	Starlab	TipOne RPT	S1180-3710, S1183- 1740, S1180-8710, S1180-9710, S1182- 1730
Etanol (grad de biologie moleculară)	Merck	Etanol absolut	1.00983.1000

ZONA PRE-PCR	FURNIZOR	DENUMIREA PRODUSULUI	NR. CATALOG
Agitator vortex	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Microcentrifugă de masă (compatibilă cu benzi de 8 eprubete)	Starlab	Mini Centrifuge	N2631-0007
Suport de separare magnetică tip 96 de godeuri	Alpaqua	96S Super Magnet Plate	A001322
Suport de separare magnetică tip 96 de godeuri	Thermo Fisher Scientific	DynaMag-96 Side Magnet	12331D
Pipete multicanal (P10; P100; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108- 1100, S7108-3300
Ciclor termic cu capac încălzit programabil	Biometra	TAdvanced 96	



ZONA PRE-PCR	FURNIZOR	DENUMIREA PRODUSULUI	NR. CATALOG
Echipament și reactiv de cuantificare fluorometrică	Thermo Fisher Scientific	Qubit 3.0 Fluorometer & Qubit dsDNA HS Assay kit	Q33216 & Q32854
Pipete cu un singur canal (P10; P100; P200; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100-1100, S7100-2200, S7100-1000

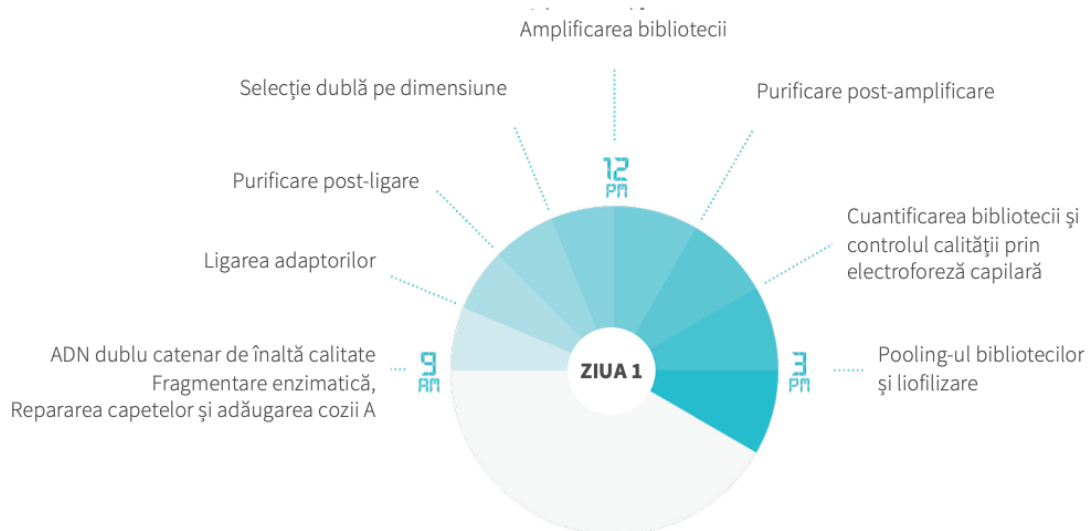
ZONA POST-PCR	FURNIZOR	DENUMIREA PRODUSULUI	NR. CATALOG
Ciclor termic cu capac încălzit programabil	Biometra	TAdvanced 96	
Sistem de electroforeză capilară	Analiză avansată	Agilent Fragment Analyzer	
Concentrator de vid (SpeedVac™ sau similar)	Thermo Fisher Scientific	Savant DNA120-230	
Încălzitor cu bloc uscat sau baie de apă (compatibil cu eprubete de 1,5 ml)	Techne	Dri-Block DB-1	
Suport de separare magnetică (compatibil cu eprubete de 1,5 ml)	Thermo Fisher Scientific	MagJET Separation Rack, 12 x 1.5 mL tube	MR02
Suport de separare magnetică (tip 96 de godeuri)	Alpaqua	96S Super Magnet Plate	A001322
Suport de separare magnetică tip 96 de godeuri	Thermo Fisher Scientific	DynaMag-96 Side Magnet	12331D
Agitator vortex	Instrumentul de grant	Multi-tube Vortex Mixer, V32	
Agitator vortex	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Microcentrifugă de masă (compatibilă cu benzi de 8 eprubete)	StarLab	Mini Centrifuge	N2631-0007
Pipete multicanal (P10; P100; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108-1100, S7108-3300
Echipament și reactiv de cuantificare fluorometrică	Thermo Fisher Scientific	Qubit 3.0 Fluorometer & Qubit dsDNA HS Assay kit	Q33216 & Q32854
Pipete cu un singur canal (P10; P100; P200; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510,



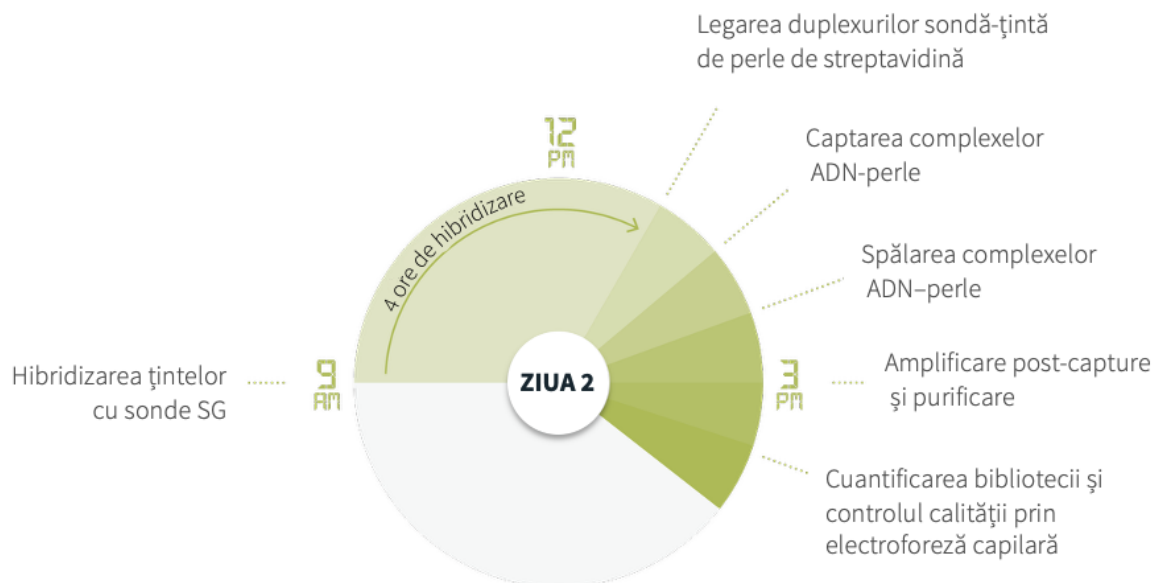
ZONA POST-PCR	FURNIZOR	DENUMIREA PRODUSULUI	NR. CATALOG
			S7100-1100, S7100-2200, S7100-1000



ANEXA 3. FLUX DE LUCRU GENERAL – SOLUȚII DE CAPTURĂ SOPHIA DDM™



Pregătirea bibliotecii Cu SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I



CAPTURĂ

FLUX DE LUCRU SIMPLIFICAT

- DOAR 1-4 TUBURI DE MANIPULAT (BIBLIOTECI MULTIPLEXATE, POOLED)
- DOAR 3 ORE TIMP DE LUCRU EFECTIV (HANDS-ON)



ANEXA 4. LISTA REGIUNILOR ȚINTĂ, APLICABILE PROBLEMATICE ȘI REGIUNI MARCATE

REGIUNI ȚINTĂ*

Regiuni țintă		
CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT
1	45794953	45795134
1	45796163	45796254
1	45796829	45797031
1	45797067	45797253
1	45797308	45797546
1	45797670	45797783
1	45797813	45798007
1	45798038	45798185
1	45798221	45798384
1	45798410	45798531
1	45798565	45798656
1	45798744	45798867
1	45798932	45799021
1	45799060	45799300
1	45800038	45800208
1	45805866	45805951
2	47596620	47596745
2	47600577	47600734
2	47600922	47601212
2	47602348	47602463
2	47604128	47604241
2	47606067	47606218
2	47606883	47607069
2	47612280	47612374



CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT
2	47613686	47613777
2	47630306	47630566
2	47635515	47635719
2	47637208	47637536
2	47639528	47639724
2	47641383	47641582
2	47643410	47643593
2	47656871	47657105
2	47672662	47672821
2	47690145	47690318
2	47693772	47693972
2	47698079	47698226
2	47702139	47702434
2	47703481	47703735
2	47705386	47705683
2	47707810	47708035
2	47709893	47710113
2	48010348	48010657
2	48018041	48018287
2	48023008	48023227
2	48025725	48028319
2	48030534	48030849
2	48032024	48032191
2	48032732	48032871
2	48033318	48033522
2	48033566	48033815
2	48033893	48034024
2	215593375	215593757
2	215595110	215595257
2	215609766	215609908
2	215610421	215610603



CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT
2	215617146	215617304
2	215632181	215632403
2	215633931	215634061
2	215645259	215646258
2	215656996	215657194
2	215661760	215661866
2	215674111	215674318
3	37035014	37035179
3	37038085	37038225
3	37042421	37042569
3	37045867	37045990
3	37048457	37048579
3	37050280	37050421
3	37053286	37053378
3	37053477	37053615
3	37055898	37056060
3	37058972	37059115
3	37061776	37061979
3	37067103	37067523
3	37070250	37070448
3	37081652	37081810
3	37083734	37083847
3	37088985	37089199
3	37089983	37090125
3	37090370	37090533
3	37091952	37092169
3	178916589	178916990
3	178917453	178917712
3	178919053	178919353
3	178921307	178921602
3	178922266	178922401



CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT
3	178927358	178927513
3	178927949	178928151
3	178928194	178928378
3	178935973	178936147
3	178936959	178937090
3	178937334	178937548
3	178937712	178937865
3	178938749	178938970
3	178941844	178942000
3	178942463	178942634
3	178943725	178943853
3	178947035	178947255
3	178947767	178947934
3	178947988	178948189
3	178951857	178952177
4	84383597	84384080
4	84384622	84384786
4	84388582	84388716
4	84390160	84390329
4	84391331	84391574
4	84393350	84393466
4	84397771	84397857
4	84403282	84403422
4	84406114	84406250
5	112043390	112043604
5	112090563	112090747
5	112101998	112102132
5	112102861	112103112
5	112111301	112111459
5	112116462	112116625
5	112128118	112128251



CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT
5	112136951	112137105
5	112151167	112151315
5	112154638	112155066
5	112157568	112157713
5	112162780	112162969
5	112163601	112163728
5	112164528	112164694
5	112170623	112170887
5	112173225	112179848
5	131892992	131893170
5	131894951	131895084
5	131911444	131911645
5	131914984	131915219
5	131915529	131915783
5	131923229	131923407
5	131923591	131923806
5	131924354	131924597
5	131925298	131925554
5	131926891	131927123
5	131927544	131927751
5	131930536	131930761
5	131931240	131931527
5	131938967	131939206
5	131939587	131939763
5	131940473	131940716
5	131944282	131944442
5	131944784	131944926
5	131944950	131945113
5	131951670	131951751
5	131951754	131951847
5	131953737	131954011



CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT
5	131972782	131972917
5	131973748	131973940
5	131976339	131976522
5	131977845	131978081
7	6013005	6013198
7	6017194	6017413
7	6018202	6018352
7	6022430	6022647
7	6026365	6027276
7	6029406	6029611
7	6031579	6031713
7	6035140	6035289
7	6036932	6037079
7	6038714	6038931
7	6042059	6042292
7	6043296	6043448
7	6043578	6043714
7	6045498	6045687
7	6048603	6048675
7	6776682	6777592
7	6781291	6781508
7	6785694	6785844
7	6786642	6786861
7	6790855	6791257
7	152345702	152346473
7	152357761	152357892
7	152373101	152373189
8	90947785	90947865
8	90949229	90949328
8	90955456	90955619
8	90958343	90958548



CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT
8	90960027	90960145
8	90965447	90965944
8	90967486	90967808
8	90970928	90971107
8	90976613	90976760
8	90982567	90982810
8	90983376	90983543
8	90990423	90990576
8	90992937	90993146
8	90993578	90993776
8	90994925	90995108
8	90996728	90996814
10	89624202	89624330
10	89653757	89653891
10	89685245	89685339
10	89690778	89690871
10	89692745	89693033
10	89711850	89712041
10	89717585	89717801
10	89720626	89720900
10	89725019	89725254
11	94153266	94153372
11	94163052	94163177
11	94168973	94169090
11	94170318	94170426
11	94178951	94179084
11	94180360	94180629
11	94189417	94189529
11	94192549	94192772
11	94194077	94194227
11	94197254	94197430



CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT
11	94200954	94201084
11	94203612	94203833
11	94204715	94204950
11	94209430	94209594
11	94211876	94212067
11	94212815	94212952
11	94219065	94219275
11	94223974	94224156
11	94225923	94225992
11	108098327	108098448
11	108098478	108098640
11	108099880	108100075
11	108106372	108106586
11	108114655	108114870
11	108115490	108115778
11	108117666	108117879
11	108119635	108119854
11	108121403	108121824
11	108122539	108122783
11	108123519	108123664
11	108124516	108124791
11	108126917	108127092
11	108128183	108128358
11	108129688	108129827
11	108137873	108138094
11	108139112	108139361
11	108141766	108141898
11	108141953	108142158
11	108143234	108143359
11	108143424	108143604
11	108150193	108150360



CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT
11	108151697	108151920
11	108153412	108153631
11	108154929	108155225
11	108158302	108158467
11	108159679	108159855
11	108160304	108160553
11	108163321	108163545
11	108164015	108164229
11	108165629	108165811
11	108167989	108168134
11	108170416	108170637
11	108172350	108172541
11	108173555	108173781
11	108175377	108175604
11	108178599	108178736
11	108180862	108181067
11	108183113	108183250
11	108186525	108186663
11	108186713	108186865
11	108188075	108188273
11	108190656	108190810
11	108192003	108192172
11	108196012	108196296
11	108196760	108196977
11	108198347	108198510
11	108199723	108199990
11	108200916	108201173
11	108202146	108202309
11	108202581	108202789
11	108203464	108203652
11	108204588	108204720



CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT
11	108205671	108205861
11	108206547	108206713
11	108213924	108214123
11	108216445	108216660
11	108217981	108218117
11	108224468	108224632
11	108225513	108225626
11	108235784	108235970
11	108236027	108236260
13	32890573	32890689
13	32893189	32893487
13	32899188	32899346
13	32900213	32900312
13	32900354	32900444
13	32900611	32900775
13	32903555	32903654
13	32905031	32905192
13	32906384	32907549
13	32910377	32915358
13	32918670	32918815
13	32920939	32921058
13	32928973	32929450
13	32930540	32930771
13	32931854	32932091
13	32936635	32936855
13	32937291	32937695
13	32944514	32944719
13	32945068	32945262
13	32950782	32950953
13	32953429	32953677
13	32953862	32954075



CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT
13	32954119	32954307
13	32968801	32969095
13	32971010	32971206
13	32972274	32972932
16	23614755	23615015
16	23619160	23619358
16	23625300	23625437
16	23632667	23632824
16	23634265	23634476
16	23635305	23635440
16	23637532	23637743
16	23640500	23640621
16	23640936	23641815
16	23646158	23647680
16	23649146	23649298
16	23649366	23649475
16	23652406	23652503
16	68771294	68771391
16	68772175	68772339
16	68835548	68835821
16	68842302	68842495
16	68842571	68842776
16	68844075	68844269
16	68845562	68845787
16	68846013	68846191
16	68847191	68847423
16	68849393	68849687
16	68853158	68853353
16	68855879	68856153
16	68857277	68857554
16	68862052	68862232



CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT
16	68863532	68863725
16	68867168	68867427
17	7572902	7573033
17	7573902	7574058
17	7576568	7576682
17	7576828	7576951
17	7576994	7577180
17	7577474	7577633
17	7578152	7578314
17	7578346	7578579
17	7579287	7579615
17	7579675	7579746
17	7579814	7579937
17	33427947	33428080
17	33428195	33428409
17	33430248	33430368
17	33430448	33430588
17	33433380	33433525
17	33433982	33434166
17	33434360	33434491
17	33443909	33444081
17	33445495	33445663
17	33446105	33446216
17	33446526	33446657
17	41197670	41197844
17	41199635	41199745
17	41201113	41201236
17	41203055	41203159
17	41209044	41209177
17	41215325	41215415
17	41215866	41215993



CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT
17	41219600	41219737
17	41222920	41223280
17	41226323	41226563
17	41228480	41228656
17	41231326	41231441
17	41234396	41234617
17	41242936	41243074
17	41243427	41246902
17	41247838	41247964
17	41249236	41249331
17	41251767	41251922
17	41256114	41256303
17	41256860	41256998
17	41258448	41258575
17	41267718	41267821
17	41276009	41276138
17	56769980	56770174
17	56772267	56772579
17	56774029	56774245
17	56780532	56780715
17	56787195	56787376
17	56798082	56798198
17	56801376	56801486
17	56809820	56809930
17	56811454	56811608
17	59760632	59761526
17	59763172	59763551
17	59770766	59770898
17	59793287	59793449
17	59820349	59820520
17	59821768	59821977



CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT
17	59853737	59853948
17	59857597	59857787
17	59858176	59858391
17	59861606	59861810
17	59870933	59871115
17	59876436	59876685
17	59878589	59878860
17	59885803	59886143
17	59924437	59924606
17	59926465	59926642
17	59934394	59934617
17	59937132	59937293
17	59938783	59938925
19	1206888	1207227
19	1218391	1218524
19	1219298	1219431
19	1220347	1220529
19	1220555	1220741
19	1221187	1221364
19	1221923	1222030
19	1222959	1223196
19	1226428	1226671
22	29083860	29083999
22	29085098	29085228
22	29089995	29090130
22	29091090	29091255
22	29091673	29091886
22	29092864	29093000
22	29095801	29095950
22	29099468	29099579
22	29105969	29106072



CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT
22	29107872	29108030
22	29115358	29115498
22	29120940	29121137
22	29121206	29121380
22	29130366	29130734

*O regiune țintă este poziția în care pipeline-ul va raporta variantele cu încredere ridicată atunci când acestea sunt prezente. Coordonatele sunt bazate pe indexare de la 1, iar coordonata finală este inclusă în regiune.

REGIUNI PROBLEMATICE APLICABILE**

CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT
chr2	48018282	48018315
chr3	37067075	37067120
chr5	112111309	112111311
chr11	94152620	94152662
chr17	59757835	59757859

**O regiune problematică este o anumită regiune intronică din cadrul țintei și ar putea cauza o anumită incertitudine în detectarea variantelor. Acest lucru ar putea fi legat de tehnologia de secvențiere. O variantă detectată în această regiune va fi „scăzută (Low)” în tabelul de încredere din SOPHiA DDM™. Coloana de filtrare a variantei corespunzătoare din tabelul final complet al variantelor va fi marcată ca „regiuni problematice”. Coordonatele sunt bazate pe indexare de la 1, iar coordonata finală este inclusă în regiune.

REGIUNI MARCATE APLICABILE***

Regiuni marcate aplicabile

CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT	DESCRIERE
2	47635515	47635560	variantele din această regiune pot fi afectate de artefacte de secvențiere



CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT	DESCRIERE
2	48032732	48032820	variantele din această regiune pot fi afectate de artefacte de secvențiere
3	37067103	37067240	variantele din această regiune pot fi afectate de artefacte de secvențiere
7	6036932	6037079	variantele din această regiune pot fi afectate de artefacte de secvențiere
3	178937334	178937548	regiunea este foarte similară cu o altă regiune genomică (regiunea cu cea mai mare similaritate este chr22:17053913–17054324, hg19/GRCh37) – variantele trebuie interpretate cu atenție
3	178937712	178937865	regiunea este foarte similară cu o altă regiune genomică (regiunea cu cea mai mare similaritate este chr22:17054288–17054442, hg19/GRCh37) – variantele trebuie interpretate cu atenție
7	6012845	6013198	regiunea este foarte similară cu o altă regiune genomică (regiunea cu cea mai mare similaritate se află în pseudogenul PMS2CL, chr7:6790854–6791209, hg19/GRCh37) – variantele trebuie interpretate cu atenție
7	6017194	6017413	regiunea este foarte similară cu o altă regiune genomică (regiunea cu cea mai mare similaritate se află în pseudogenul PMS2CL, chr7:6786641–6786861, hg19/GRCh37) – variantele trebuie interpretate cu atenție
7	6018202	6018352	regiunea este foarte similară cu o altă regiune genomică (regiunea cu cea mai mare similaritate se află în pseudogenul PMS2CL, chr7:6785693–6785844, hg19/GRCh37) – variantele trebuie interpretate cu atenție
7	6022430	6022647	regiunea este foarte similară cu o altă regiune genomică (regiunea cu cea mai mare similaritate se află în pseudogenul PMS2CL, chr7:6781290–6781508, hg19/GRCh37) – variantele trebuie interpretate cu atenție
7	6026365	6027276	regiunea este foarte similară cu o altă regiune genomică (regiunea cu cea mai mare similaritate se află în pseudogenul PMS2CL, chr7:6776681–6777592, hg19/GRCh37) – variantele trebuie interpretate cu atenție
7	6776682	6777592	regiunea este foarte similară cu o altă regiune genomică (regiunea cu cea mai mare similaritate se află în gena PMS2, chr7:6026364–6027276, hg19/GRCh37) – variantele trebuie interpretate cu atenție
7	6781291	6781508	regiunea este foarte similară cu o altă regiune genomică (regiunea cu cea mai mare similaritate se află în gena PMS2,



CROMOZOM	ÎNCEPUT	SFÂRȘIT	DESCRIERE
			chr7:6022429-6022647, hg19/GRCh37) – variantele trebuie interpretate cu atenție
7	6785694	6785844	regiunea este foarte similară cu o altă regiune genomică (regiunea cu cea mai mare similaritate se află în gena PMS2, chr7:6018201-6018352, hg19/GRCh37) – variantele trebuie interpretate cu atenție
7	6786642	6786861	regiunea este foarte similară cu o altă regiune genomică (regiunea cu cea mai mare similaritate se află în gena PMS2, chr7:6017193-6017413, hg19/GRCh37) – variantele trebuie interpretate cu atenție
7	6790855	6791257	regiunea este foarte similară cu o altă regiune genomică (regiunea cu cea mai mare similaritate se află în gena PMS2, chr7:6012796-6013198, hg19/GRCh37) – variantele trebuie interpretate cu atenție
22	29085098	29085228	regiunea este foarte similară cu o altă regiune genomică (regiunea cu cea mai mare similaritate este chr16:33366704-33366835, hg19/GRCh37) – variantele trebuie interpretate cu atenție

***O regiune marcată este o anumită regiune care se suprapune peste un exon și ar putea cauza o anumită incertitudine în detectarea variantelor, de exemplu, complexitate scăzută, zgomot, pseudogen etc. Acest lucru ar putea depinde de tehnologia de secvențiere. O variantă detectată în această regiune nu va fi clasificată ca fiind de încredere scăzută în SOPHiA DDM™, dar va fi asociată cu un triunghi de avertizare, iar un mesaj de avertizare detaliat poate fi găsit în fila de avertismente. Coloana de filtrare a variantei corespunzătoare din tabelul final al variantei complete nu va fi marcată din cauza acestei regiuni. Coordonatele sunt bazate pe indexare de la 1, iar coordonata finală este inclusă în regiune.



Document Approvals
Approved Date: 07 Apr 2026

Approval Verdict: Approve	Coleman Spence, (cspence@sophiagenetics.com) Regulatory Approval 07-Apr-2026 20:10:25 GMT+0000
------------------------------	---

QA Approval Verdict: Approve	Denisa Dzulova, (ext-ddzulova@sophiagenetics.com) Quality Assurance Approval 07-Apr-2026 20:14:31 GMT+0000
---------------------------------	---