

# INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

---

32 DE PROBE

## SOPHiA DDM™ Dx RNAtarget Oncology Solution



Pentru diagnostic in vitro (IVD)  
Nu este destinat autotestării

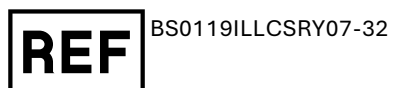
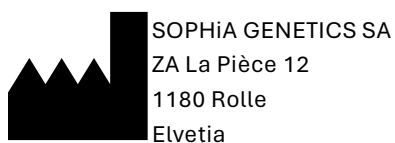




## INFORMAȚII SINTETIZATE

Denumirea produsului	SOPHiA DDM™ Dx RNAtarget Oncology Solution
Tip produs	Protocol combinat
Familia de produse	Kit molecular + componentă analitică
ID algoritm	ILL1XGR1S2_FFPE_NextSeq
Secvențiator	Illumina® - NextSeq® 550
ID panou genetic	ROS_v1
Versiunea produsului	v1.0
Tipul probei	ARN izolat din probe de țesut fixate în formalină și incluse în parafină (FFPE)
Versiunea de lansare	1.0.0
ID document	SG-09157
Versiunea documentului	V1.0
Data revizuirii	7 aprilie 2026

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





## CODURI DE PRODUS

	<b>CODUL COMPLET AL PRODUSULUI</b>	<b>BOX 1</b>	<b>BOX 2</b>	<b>KIT DE PREGĂTIRE A BIBLIOTECII</b>
<b>REF</b>	BS0119ILLCSRY07-32	B1.L1.0019.C-32	B2.0019.C-48	6C0233



# 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 NextSeq® 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.

Agilent Fragment Analyzer™ este o marcă comercială a Agilent Technologies, Inc.

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 echivalentă în limba engleză	Data  DESCRIEREA MODIFICĂRII
SG-09157 – v1.0	SG-00662 – v8.0	7 aprilie 2026 • Versiunea inițială



# CUPRINS

1. Scopul prevăzut .....	8
2. Prezentare generală a principiilor testului și a procedurii .....	9
3. Componentele produsului .....	10
4. Modul SOPHiA DDM™ Dx.....	11
5. Materiale și metode pentru kit .....	12
5.1. Considerații inițiale .....	12
5.1.1. Conținutul kitului (32 de probe).....	12
5.1.2. Materiale necesare (nu sunt furnizate) .....	17
5.2. Pregătirea bibliotecii.....	18
5.2.1. Prepararea ARN total .....	18
5.2.2. Prepararea preamestecurilor și a reactivilor .....	20
5.2.3. Transcriere inversă (RT) - ARN FFPE.....	22
5.2.4. Sinteza ADNc pentru a doua catenă .....	24
5.2.5. Curățarea ADNc .....	25
5.2.6. Repararea capetelor și A-Tailing.....	26
5.2.7. Ligare .....	27
5.2.8. Curățarea post-ligare .....	28
5.2.9. Amplificarea bibliotecii .....	29
5.2.10. Curățarea după amplificare.....	30
5.3. Cuantificarea bibliotecilor individuale și controlul calității .....	31
5.4. Captură.....	32
5.4.1. Gruparea bibliotecilor pentru hibridizare și captură.....	32
5.4.2. Hibridizarea.....	32
5.4.3. Pregătirea bilelor magnetice de streptavidină.....	35
5.4.4. Legarea țintei hibridizate la bilele magnetice .....	36
5.4.5. Spălarea bilelor magnetice de streptavidină pentru a îndepărta ADN-ul nelegat .....	37
5.5. Amplificarea post-captură .....	39
5.6. Curățarea amplificării post-captură .....	40
5.7. Cuantificarea finală a bibliotecii și controlul calității .....	41
5.8. Pregătirea bibliotecii pentru secvențiere .....	42
6. Procedura de analiză.....	43
6.1. Demultiplexarea datelor NGS .....	43
6.2. Încărcarea și analiza datelor .....	43
6.3. Generarea raportului .....	43
7. Descrierea și parametrii analizei.....	46
7.1. Fișiere de resurse .....	46
7.2. Gene țintă .....	46
7.3. Preprocesarea datelor brute .....	47
7.3.1. Preprocesare.....	47
7.3.2. Aliniere.....	47
7.4. Lista modulelor incluse .....	47
7.4.1. Modul de detectare a fuziunii genice/a evenimentelor de exon-skipping: .....	47
7.4.2. Indicator de calitate.....	49
8. Evaluarea performanței .....	50



8.1. Evaluarea performanțelor analitice .....	50
8.1.1. Concordanța statutului de fuziune / exon-skipping cu testul NGS comparator .....	50
8.1.2. Limita de detecție pentru fuziuni / evenimente de exon-skipping .....	50
8.1.3. Repetabilitatea statutului de fuziune/exon-skipping .....	51
8.2. Evaluarea performanțelor clinice .....	51
9. Avertismente, măsuri de precauție și limitări .....	52
9.1. Avertismente generale .....	52
9.2. Măsuri generale de precauție .....	52
9.3. Limitări generale .....	53
10. Referințe.....	65
11. Simboluri.....	66
12. Asistență .....	67
13 Depanare .....	68
14. ANEXA II - Plăci de primeri cu index dublu unic.....	70



# 1. SCOPUL PREVĂZUT

SOPHiA DDM™ Dx RNAtarget Oncology Solution (ROS, „Produsul”) este destinat utilizării pentru identificarea fuziunilor genice relevante clinic care implică genele *ALK*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FGFR4*, *NRG1*, *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *RET* și *ROS1*, precum și evenimente de exon-skipping (omitere a exonului) în *EGFR* și *MET* în ARN extras din probe de țesut fixate în formalină și incluse în parafină (FFPE) de la pacienți diagnosticați cu cancer pulmonar, prin țintirea unor transcrieri specifice. Funcția produsului este de a oferi un suport profesioniștilor din domeniul sănătății în luarea deciziilor clinice legate de fuziuni genice/evenimente de exon-skipping și de a furniza o justificare moleculară pentru strategia adecvată de gestionare a bolii. Produsul este un dispozitiv semi-automat, calitativ, destinat a fi utilizat ca diagnostic in vitro numai pentru uz profesional.





## 2. PREZENTARE GENERALĂ A PRINCIPIILOR TESTULUI ȘI A PROCEDURII

Genele de fuziune sunt biomarkeri clinici importanți în oncologie, care ghidează diagnosticul, oferă informații prognostice și susțin deciziile de tratament<sup>1</sup>. De exemplu, până la 17% din tumorile solide sunt caracterizate de fuziuni genice. Fuziunile genice se numără printre cele mai de succes ținte ale medicinei de precizie în tratarea cancerului, numeroase terapii vizând proteinele de fuziune fiind utilizate în mod curent în practica clinică. Cea mai cuprinzătoare metodă de detectare a fuziunilor este utilizarea analizelor bazate pe ARN prin secvențiere de nouă generație (NGS), care pot detecta atât fuziuni noi, cât și fuziuni cunoscute.

SOPHiA DDM™ Dx RNATarget Oncology Solution (ROS) este un test bazat pe NGS dezvoltat de SOPHiA GENETICS destinat detecției calitative, adnotării și pre-clasificării fuziunilor genice sau a evenimentelor de exon-skipping și include un panou multi-genic adecvat pentru diferite tipuri de tumori solide. Produsul este destinat procesării și analizei probelor de ARN extrase din probe de țesut pulmonar provenite din biopsii sau rezecții chirurgicale ale pacienților, fixate în formalină și incluse în parafină (FFPE). Kitul și protocolul NGS sunt concepute pentru a permite utilizatorilor să proceseze între 10 ng și 200 ng (recomandat 50 ng) de ARN pentru construcția bibliotecii NGS, îmbogățirea prin capturare bazată pe hibridizare a 13 gene (conform definiției din secțiunea Scopul prevăzut) și secvențierea prin utilizarea platformei Illumina® NextSeq® 550.

Modul SOPHiA DDM™ Dx bazat pe cloud securizat, care găzduiește un pipeline bioinformatic personalizat, permite utilizatorilor să încarce datele NGS și să obțină un raport SOPHiA DDM™ Dx ROS Solution în format PDF. Raportul descrie fuziunea detectată și evenimentele de exon-skipping într-o probă, scorul calității și starea probei. Doar evenimentele de fuziune implicate în cele 11 gene țintă și evenimentele de exon-skipping (MET ex14, EGFRvIII) în cele 2 gene țintă definite în secțiunea Scopul prevăzut vor fi raportate în Raportul IVD, cu lista transcrierilor prezentată în Tabelul 1.

**Tabelul 1. Lista transcrierilor implicate în fuziuni relevante din punct de vedere clinic în Raportul IVD**

Genă	ID RefSeq	Genă	ID RefSeq
<b>ALK</b>	NM_004304	<b>NRG1</b>	NM_013964
<b>EGFR</b>	NM_005228	<b>NTRK1</b>	NM_002529
<b>FGFR1</b>	NM_023110	<b>NTRK2</b>	NM_006180
<b>FGFR2</b>	NM_000141	<b>NTRK3</b>	NM_001012338
<b>FGFR3</b>	NM_000142	<b>RET</b>	NM_020975
<b>FGFR4</b>	NM_213647	<b>ROS1</b>	NM_002944
<b>MET</b>	NM_000245		

Acest tabel se bazează pe COSMIC<sup>2</sup> sau pe bazele de date ChimerDB<sup>3</sup>, pentru care se furnizează adnotarea în raport. Pentru orice fuziune care implică o transcriere din afara acestei liste, se vor furniza doar coordonatele genomice.

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).

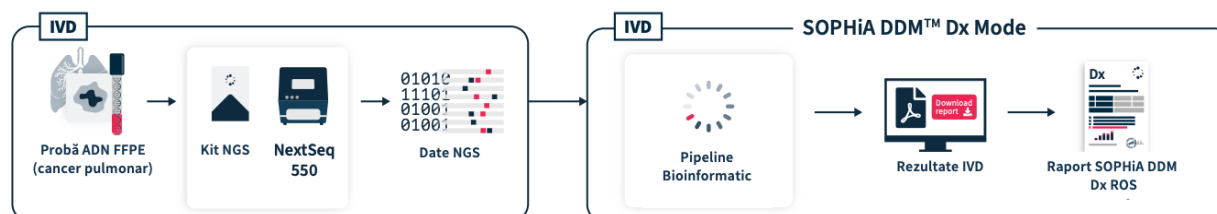


### 3. COMPONENTELE PRODUSULUI

SOPHiA DDM™ Dx ROS este o soluție completă care include kitul de îmbogățire a țintelor împreună cu puterea analitică a inteligenței artificiale și este utilizată împreună cu un accesoriu IVD, modul bazat pe cloud SOPHiA DDM™ Dx. Produsul este format din două componente: Kitul de pregătire a bibliotecii și de captură (SOPHiA GENETICS™ Dx RNA Library Prep Kit IV – 32 de reacții) și pipeline-ul bioinformatic analitic utilizat în combinație cu modul SOPHiA DDM™ Dx.

- Kitul este compus din reactivi și protocoale pentru a susține pregătirea și îmbogățirea bibliotecilor țintite, compatibile cu Illumina®, din ARN extras din probe FFPE de cancer pulmonar, fiind adecvat pentru îmbogățire și secvențiere pe un secvențiator Illumina® NextSeq® 550.
- Scopul principal al pipeline-ului bioinformatic este de a efectua filtrarea citirilor, alinierea și fuziunea și detectarea omiterii exonului (exon-skipping) (analiză secundară) și adnotarea (analiză terțiară), pentru a stabili fuziunea SOPHiA DDM™ Dx ROS și detectarea omiterii exonului.
- Modul SOPHiA DDM™ Dx găzduiește pipeline-ul bioinformatic și servește drept interfață grafică pentru încărcarea datelor de secvențiere Next-Generation Sequencing (NGS) și generarea și descărcarea raportului SOPHiA DDM™ Dx ROS. Consultați Manualul de utilizare al modului SOPHiA DDM™ Dx pentru instrucțiuni operaționale.

**Figura 1. Prezentare generală a componentelor produsului**





## 4. MODUL SOPHIA DDM™ DX

Modul SOPHiA DDM™ Dx este o aplicație web care oferă o soluție software pentru clinicieni și cercetători, pentru a sprijini luarea deciziilor informate și stabilirea diagnosticului în oncologie și în bolile ereditare, inclusiv în afecțiuni dificil de diagnosticat, precum bolile rare. Aceasta se realizează prin analiza datelor de secvențiere de nouă generație (NGS) obținute din biblioteci de genom întreg, biblioteci obținute prin kituri de captură ADN sau ARN, precum și din kituri bazate pe ampliconi, pentru aplicații germinale și somatice. Modul SOPHiA DDM™ Dx este destinat utilizării de către personal de laborator instruit, geneticieni clinici și patologii moleculari.

Pentru a accesa platforma pentru prima dată, utilizatorul va trebui să se înregistreze. Utilizatorul este rugat să parcurgă următorii pași:

- Selectați „*Inregistrați-vă acum*”.
- Introduceți adresa dvs. de e-mail. Trebuie să utilizați aceeași adresă de e-mail care a fost utilizată pentru a vă crea contul la configurarea contului. Dacă aveți nelămuriri, vă rugăm să contactați administratorul contului dumneavoastră.
- Selectați „*Trimiteți codul de verificare*”.
- Codul de verificare va fi trimis la adresa dvs. de e-mail. Introduceți codul primit prin e-mail și finalizați procesul prin introducerea numelui dvs. și crearea unei parole noi.

Instrucțiunile detaliate pentru accesarea platformei și efectuarea unei cereri de analiză genomică sunt disponibile în Manualul de utilizare a modului SOPHiA DDM™ Dx.



## 5. MATERIALE ȘI METODE PENTRU KIT

### 5.1. Considerații inițiale

Vă rugăm să vă asigurați că toate eprubetele sunt intacte din punct de vedere fizic și depozitate la temperaturile 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.

#### 5.1.1. Conținutul kitului (32 de probe)

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

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

- Universal Blockers - TS Mix (12 µl)
- Human Cot DNA (25 µl)
- ROS\_v1 probes by SOPHiA GENETICS (18 µl)
- 2x Hybridization Buffer (75 µl)
- Hybridization Buffer Enhancer (30 µl)
- 2x Bead Wash Buffer (1250 µl)
- 10x Stringent Wash Buffer (200 µl)
- 10x Wash Buffer I (160 µl)
- 10x Wash Buffer II (110 µl)
- 10x Wash Buffer III (110 µl)
- 32 Illumina®-compatible Unique Dual Index Primers V2 in a 96-well plate format (7 µl each): see Appendix II for primers display and sequences.
- Post Capture Illumina® Primers Mix (20 µl)
- PCR Enhancer (20 µl)
- Post Capture PCR Master Mix 2x (122 µl)

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

- Dynabeads® M-270 Streptavidin (440 µl)
- Agencourt® AMPure® XP (11,6 ml)
- IDTE Low TE Buffer (10 ml)
- Nuclease-free water (20 ml)



## SOPHiA GENETICS™ Dx RNA Library Prep Kit IV\* (A SE PĂSTRA LA -25 °C PÂNĂ LA -15 °C)

- RT Primers (85 µl)
- RT Reaction Buffer (170 µl)
- RT Enzyme Mix (86 µl)
- Second Strand Reaction Buffer (340 µl)
- Second Strand Enzyme Mix (170 µl)
- End Prep Reaction Buffer (296 µl)
- End Prep Enzyme Mix (128 µl)
- Ligation Master Mix (1268 µl)
- Ligation Enhancer (44 µl)
- Stubby Universal Adapter (220 µl)
- PCR Master Mix (2 x 520 µl)
- Nuclease-free water (2 x 1.8 ml)

\* Pentru 32 de probe, se furnizează un kit de 32 de probe.

\* SOPHiA GENETICS este distribuitorul exclusiv al acestui kit de pregătire a bibliotecilor.



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"> <li>• H300 Mortal în caz de înghițire.</li> <li>• H311 Toxic în contact cu pielea.</li> <li>• H315 Provoacă iritarea pielii.</li> <li>• H370 Provoacă leziuni ale organelor.</li> <li>• H370 Provoacă leziuni ale organelor (sistemul nervos central).</li> <li>• H411 Toxic pentru mediul acvatic, cu efecte pe termen lung.</li> <li>• P260 Nu inspirați vaporii/pulverizările.</li> <li>• P264 Spălați bine pielea contaminată după manipulare.</li> <li>• P270 Nu mâncați, nu beți și nu fumați când utilizați acest produs.</li> <li>• P273 Evitați dispersarea în mediu.</li> <li>• P280 Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/echipament de protecție a ochilor/echipament de protecție a feței.</li> <li>• P301+P310 În caz de înghițire: sunați imediat la un centru de informare toxicologică sau un medic.</li> <li>• P302+P352 În caz de contact cu pielea: Spălați cu multă apă.</li> <li>• P308+P311 În caz de expunere sau de posibilă expunere: sunați la un centru de informare toxicologică sau un medic.</li> <li>• P321 Tratament specific (consultați recomandările medicale de pe această etichetă).</li> <li>• P330 Clățiți gura.</li> </ul>	Pericol	Clorură de tetrametil-amoniu Concentrație: 49% CAS: 75-57-0



Denumirea produsului	Pictogramă GHS	Fraze de pericol și precauție	Cuvânt de semnalizare	Componentă periculoasă
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• P332+P313 În caz de iritare a pielii: consultați medicul.</li> <li>• P362+P364 Scoateți îmbrăcămintea contaminată și spălați-o înainte de reutilizare.</li> <li>• P391 Colectați scurgerile de produs.</li> <li>• P405 A se depozita sub cheie.</li> <li>• P501 Eliminați conținutul/recipientul în conformitate cu reglementările naționale.</li> </ul>		
Intensificator tampon de hibridizare		<ul style="list-style-type: none"> <li>• H351 Susceptibil de a provoca cancer.</li> <li>• H360 Poate dăuna fertilității sau fătului.</li> <li>• H373 Poate provoca leziuni ale organelor în caz de expunere prelungită sau repetată.</li> <li>• P201 Procurați instrucțiuni speciale înainte de utilizare.</li> <li>• P202 A nu se manipula decât după ce au fost citite și înțelese toate măsurile de securitate.</li> <li>• P260 Nu respirați inspirați/pulverizările.</li> <li>• P280 Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/echipament de protecție a ochilor/echipament de protecție a feței.</li> <li>• P308+P313 În caz de expunere sau de posibilă expunere: consultați medicul.</li> <li>• P314 Consultați medicul, dacă nu vă simțiți bine.</li> <li>• P405 A se depozita sub cheie.</li> <li>• P501 Eliminați conținutul/recipientul în conformitate cu reglementările naționale.</li> </ul>	Pericol	Formamidă Concentrație: 100% CAS: 75-12-7
10x tampon de spălare stringentă		<ul style="list-style-type: none"> <li>• H302 Nociv în caz de înghițire.</li> <li>• H315 Provoacă iritarea pielii.</li> <li>• H319 Provoacă o iritare gravă a ochilor</li> </ul>	Pericol	Sare disodică a acidului etilendiaminotetraacetic Concentrație: 2,5% CAS: 6381-92-6



Denumirea produsului	Pictogramă GHS	Fraze de pericol și precauție	Cuvânt de semnalizare	Componentă periculoasă
10x Tampon de spălare I		<ul style="list-style-type: none"> <li>• H228 Solid inflamabil.</li> <li>• H302 Nociv în caz de înghițire.</li> <li>• H315 Provoacă iritarea pielii.</li> <li>• H318 Provoacă leziuni oculare grave.</li> <li>• H332 Nociv în caz de inhalare.</li> <li>• H401 Toxic pentru mediul acvatic.</li> <li>• H402 Nociv pentru mediul acvatic.</li> <li>• H412 Toxic pentru mediul acvatic, cu efecte pe termen lung.</li> <li>• P273 Evitați dispersarea în mediu.</li> <li>• P280 Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/echipament de protecție a ochilor/echipament de protecție a feței.</li> <li>• 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.</li> <li>• P310 Sunați imediat la un centru de informare toxicologică sau un medic.</li> <li>• P501 Eliminați conținutul/recipientul în conformitate cu reglementările naționale.</li> </ul>	Pericol	Dodecil sulfat de sodiu Concentrație: 4,9% CAS: 151-21-3

Vă rugăm să folosiți



și



ca echipament individual de protecție.





## 5.1.2. Materiale necesare (nu sunt furnizate)

### MATERIALE FURNIZATE DE UTILIZATOR (SE ACHIZIȚIONEAZĂ SEPARAT)

- 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®

ARN izolat din materialul de referință Seraseq® FFPE Tumor Fusion RNA v4 (Seracare, nr. produs 0710-0496) poate fi utilizat ca martor pozitiv. Procesarea a 50 ng de ARN cu SOPHiA DDM™ Dx ROS ar trebui să permită detectarea tuturor rearanjamentelor țintite prezente în acest material.

### 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
  - Echipament și reactiv 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)



- Bloc termic sau baie de apă (compatibile cu eprubete de 1,5 ml)
- Agitator vortex

## 5.2. Pregătirea bibliotecii

### 5.2.1. Prepararea ARN total

#### MATERIALE

- ARN extras din țesut fixat în formalină și inclus în parafină (ARN FFPE) (\*A se vedea nota de mai jos)
- IDTE
- Apă fără conținut de nuclează
- Benzi de 8 eprubete de 0,2 ml fără RNase/DNase



**Notă:** Probele de țesut FFPE de intrare trebuie să fie supuse unei deparafinări histologice standard, urmată de purificarea ARN-ului. Metoda de purificare a ARN-ului aleasă trebuie să asigure conservarea eficientă a ARN-ului și eliminarea altor componente, cum ar fi hemoglobina, EDTA, săruri, detergenți, proteaze, solvenți organici și alți compuși care au un impact potențial negativ asupra reacțiilor enzimatiche ulterioare. Recomandăm stocarea ARN-ului purificat într-o soluție tampon compusă din 10 mM Tris pH 7,5 sau 8,0 și 0,1 mM EDTA.



**IMPORTANT: SOPHiA DDM™ Dx ROS este destinat probelor cu un conținut tumoral de cel puțin 20%. Procesarea ARN-ului din probe cu un conținut tumoral sub 20% nu este susținută de această soluție.**

#### Manipularea ARN-ului

Ribonucleazele (RNase) sunt enzime foarte răspândite și stabile, care pot degrada rapid moleculele de ARN. Prin urmare, atunci când se lucrează cu ARN, trebuie luate anumite măsuri de precauție pentru a evita contaminarea cu RNase:

- Decontaminați-vă spațiul de lucru, folosiți mănuși, pipete și produse de curățare cu nuclează înainte de a lucra cu ARN.
- Păstrați ARN-ul purificat pe gheață în timpul lucrului și depozitați-l la -80 °C.
- Purtați un halat de laborator și schimbați mănușile frecvent.
- Utilizați instrumente de unică folosință din plastic fără nuclează, vârfuri de pipetă cu bariere de aerosoli și reactivi fără nuclează.

#### Integritatea ARN-ului

Calitatea ARN-ului extras din FFPE este variabilă și poate afecta datele de secvențiere. Expunerea la formalină afectează integritatea moleculelor prin fragmentarea acizilor nucleici și modificări chimice. De asemenea, induce artefacte de secvențiere din cauza evenimentelor de dezaminare.

Integritatea ARN-ului din probele de ARN FFPE trebuie evaluată înainte de experiment utilizând electroforeză capilară de înaltă rezoluție (de exemplu, sistemele Agilent Fragment Analyzer™, Agilent Bioanalyzer™, Agilent TapeStation™).



**Important: procesarea unei probe fără măsurarea DV200 (procentul de fragmente ARN cu o dimensiune de cel puțin 200 pb) sau a unui DV200 mai mic de 20% poate duce la un randament suboptimal al pregătirii bibliotecii și la o calitate insuficientă a datelor NGS, ceea ce poate duce la rezultate neconcludente (consultați secțiunea Avertismente și limitări).**

## Cuantificarea ARN-ului

Pentru a pipeta cu exactitate cantitatea corectă de soluție de ARN de intrare, vă recomandăm să efectuați o diluție inițială pentru a obține o concentrație cuprinsă între 10 și 50 ng/μl. Concentrația ARN trebuie confirmată printr-o cuantificare fluorometrică (de exemplu, Qubit™, Thermo Fisher), iar valoarea obținută se utilizează pentru a calcula diluția finală.

## Cerințe privind cantitatea de intrare și ciclurile PCR

Fluxul de lucru a fost optimizat pentru probe de ARN FFPE. Cantitatea de intrare recomandată este de 50 ng de ARN total. Pregătirea bibliotecilor este posibilă cu cantități de intrare cuprinse între 10 ng și 200 ng; cu toate acestea, caracteristicile de performanță ale cantităților mai mari de 50 ng nu au fost stabilite în mod sistematic.

În funcție de metrica DV200 pentru fiecare probă, ajustați numărul de cicluri PCR pentru amplificarea bibliotecii (Secțiunea 5.2.9) în conformitate cu tabelul următor:

**Tabelul 2. Numărul de cicluri PCR necesare în funcție de calitatea materialului de pornire.**

FFPE DV200 < 50%	FFPE DV200 ≥ 50%
12	10

### NOTĂ:

- Utilizarea unei cantități de ARN mai mici de 50 ng poate necesita efectuarea unor cicluri PCR suplimentare în timpul amplificării bibliotecii pentru a asigura un randament suficient al bibliotecii.
- Nu recomandăm utilizarea probelor cu DV200 < ~20%, deoarece acest lucru poate duce la scăderea performanței testului.



## PROCEDURĂ

1. Decongealați probele de ARN pe gheață.
2. Pregătiți următoarele benzi PCR în funcție de numărul de reacții:

**La aranjarea probelor, se recomandă ca probele supuse sintezei de ADNc, care vor fi ulterior amplificate cu același număr de cicluri PCR, să fie plasate în eprubete adiacente. Acest lucru va facilita separarea eprubetelor pentru etapa PCR.**

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

3. Pregătiți o diluție pentru fiecare probă de ARN extras din FFPE (ARN FFPE) în numărul corespunzător de benzi PCR, după cum urmează:

DILUȚIE ARN FFPE	
1-12 $\mu$ l ARN FFPE	ARN FFPE (cf. Tabelului 2 de pe pagina anterioară, Secțiunea 5.2)
IDTE	Completați până la 12 $\mu$ l

- 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. Păstrați probele pe gheață.



**Sfat:** punct de oprire sigur peste noapte sau mai mult timp la -80 °C.

### 5.2.2. Prepararea preamestecurilor și a reactivilor

#### COMPONENTE ȘI REACTIVI

- Tampon de reacție RT
- Amestec de enzimi RT
- Tampon pentru reacția de sinteză a celei de a doua catene
- Amestec de enzimi pentru cea de a doua catenă
- Tampon pentru reacția de pregătire a capetelor (End Prep)
- Amestec de enzimi pentru pregătirea capetelor (End Prep)
- Intensificator de ligare
- Amestec principal de ligare
- PCR Master Mix 2x
- Apă fără conținut de nuclează
- Bile magnetice AMPure<sup>®</sup> XP echilibrate la temperatura camerei



## PREGĂTIRE

- Scoateți componentele SOPHiA GENETICS™ Dx RNA Library Prep Kit IV din depozitarea la -20 °C și decongelați-le pe gheață.
- Scoateți placa de primeri cu indici duali unici 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. Agitați cu vortex bine bilele magnetice AMPure® XP pentru a asigura resuspendarea corespunzătoare a bilelor magnetice, înainte de utilizare în toate etapele ulterioare.
- Preparați etanol proaspăt 80% (volumul în conformitate cu următoarea schemă, în funcție de numărul de reacții):

ETANOL 80%				
Numărul de reacții	8	16	24	32
Etanol 80% (în ml)	20	30	40	50

- Asigurați-vă că tamponul pentru reacția End Prep SOPHiA GENETICS™ Dx RNA Library Prep Kit IV este complet decongelat. Dacă se observă un precipitat în tampon, pipetați în sus și în jos de mai multe ori pentru a-l descompune și agitați cu vortex până la resuspensia completă. Amplasați pe gheață până la utilizare.
- Amestecați bine și se centrifugați toți reactivii înainte de utilizare și plasați-i pe gheață.

## PREAMESTECTURI

1. Pregătiți **preamestecul RT** după cum urmează:
- 2.

PREAMESTEC RT				
Numărul de reacții	8	16	24	32
Tampon de reacție RT (în µl)	38,4	76,8	115,2	153,6
Amestec de enzimi RT (în µl)	19,2	38,4	57,6	76,8

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



2. Pregătiți **preamestecul pentru sinteza celei de a doua catene** după cum urmează:

<b>PREAMESTEC PENTRU SINTEZA CELEI DE A DOUA CATENE</b>				
<b>Numărul de reacții</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>32</b>
Tampon pentru reacția de sinteză a celei de a doua catene (în µl)	76,8	153,6	230,4	307,2
Amestec de enzimi pentru cea de a doua catenă (în µl)	38,4	76,8	115,2	153,6
Apă fără conținut de nuclează (în µl)	460,8	921,6	1382,4	1843,2

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

3. Pregătiți **preamestecul End Prep** după cum urmează:

<b>PREAMESTEC END PREP</b>				
<b>Numărul de reacții</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>32</b>
Tampon End Prep (în µl)	67,2	134,4	201,6	268,8
Amestec de enzimi End Prep (în µl)	28,8	57,6	86,4	115,2

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

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

<b>PREAMESTEC DE LIGARE</b>				
<b>Numărul de reacții</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>32</b>
Amestec principal de ligare (în µl)	290	580	870	1160
Intensificator de ligare (în µl)	9,7	19,3	28,95	38,6

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



**Important: Amestecul de ligare și preamestecul enzimatic pentru a doua catenă sunt foarte vâscoase; pipetați ușor și asigurați-vă că obțineți un preamestec de ligare omogen.**

## 5.2.3. Transcriere inversă (RT) - ARN FFPE

### MATERIALE

- Probe de ARN FFPE diluate (12 µl)
- Primeri RT
- Preamestec RT
- Benzi de 8 eprubete de 0,2 ml fără RNase/DNase



## PREGĂTIRE

1. Pregătiți ciclul termic pentru RT cu următoarele setări:

	TEMPERATURĂ (°C)	TIMP (MINUTE)
Capac	99	
Pasul 1: Aliniere primeri	65	5
Pasul 2: Menținere	4	∞
Pasul 3: Extindere primeri	25	10
Pasul 4: Transcrierea inversă	42	15
Pasul 5: Dezactivarea enzimei	70	15
Pasul 6: Menținere	4	∞

**Notă: dacă aparatul dvs. PCR nu vă permite să întrerupeți programul și să-l reluați pentru pasul următor, puteți utiliza două programe separate pentru pașii 1-2 și pașii 3-6.**

2. Porniți programul RT. Când blocul ajunge la Pasul 1, întrerupeți programul.

## PROCEDURĂ



**Important: păstrați întotdeauna probele și preamestecul pe gheață, atât înainte, cât și după incubare, pentru a preveni degradarea ARN-ului și pentru a bloca reacțiile enzimatice.**

1. Pentru a facilita pipetarea, creați un rezervor de primeri RT într-un nou set de benzi PCR, în conformitate cu următoarea schemă:

NUMĂRUL DE REACȚII	8	16	24	32
Bandă PCR (1 bandă)	4 eprubete	8 eprubete	8 eprubete	8 eprubete
Primeri RT (în $\mu$ l)	4,5	4,5	7,0	9,0

2. Pentru a facilita pipetarea, creați un rezervor de preamestec RT într-un nou set de benzi PCR, în conformitate cu următoarea schemă:

NUMĂRUL DE REACȚII	8	16	24	32
Bandă PCR (1 bandă)	4 eprubete	8 eprubete	8 eprubete	8 eprubete
Preamestec RT (în $\mu$ l)	13	13	19,5	26,5

3. Pregătiți reacția după cum urmează:

- Folosind o pipetă multicanal, adăugați 2  $\mu$ l de primeri RT la 12  $\mu$ l de probe de ARN FFPE.
- Amestecați prin pipetare în sus și în jos de 5 ori și centrifugați scurt într-o microcentrifugă.

4. Introduceți eprubetele în ciclul termic preîncălzit la 65 °C cu programul RT. Lăsați tuburile în ciclul termic în timpul pașilor 1 și 2 (incubare la 65 °C și răcire la 4 °C). După ce probele au ajuns la 4 °C,



scoateți tuburile din ciclul termic, centrifugați-le scurt și continuați să pregătiți reacția (pe gheață) după cum urmează:

- Folosind o pipetă multicanal, adăugați 6 μl de preamestec RT la cei 14 μl de probe de ARN și primeri RT (20 μl în benzi de 4 sau 8 eprubete).
- Amestecați prin pipetare în sus și în jos de 5 ori și centrifugați scurt într-o microcentrifugă.



**Important: eprubetele trebuie păstrate pe gheață înainte și după incubarea la 65 °C pentru a evita degradarea moleculelor de ARN.**

5. Introduceți reacția în ciclul termic și continuați programul RT (pașii 3-6).

Treceți imediat la sinteza cDNA pentru a doua catenă.

## 5.2.4. Sinteza ADNc pentru a doua catenă

### MATERIALE

- Produs de reacție RT în 20 μl
- Preamestec pentru a doua catenă

### PREGĂTIRE

- Setează ciclul termic la 16 °C (cu capacul deschis).

### PROCEDURĂ



**Important: păstrați întotdeauna probele și preamestecul pe gheață, atât înainte, cât și după incubare, pentru a preveni degradarea ARN-ului și pentru a bloca reacțiile enzimatice.**

1. Pentru a facilita pipetarea, creați un rezervor de preamestec pentru a doua catenă prin adăugarea următoarelor volume la un nou set de benzi cu 4 sau 8 eprubete, în conformitate cu următoarea schemă:

NUMĂRUL DE REACȚII	8	16	24	32
<b>Bandă PCR (1 bandă)</b>	<b>4 eprubete</b>	<b>8 eprubete</b>	<b>8 eprubete</b>	<b>8 eprubete</b>
Preamestec pentru a doua catenă (în μl)	135	135	203	270

2. Pregătiți reacția după cum urmează:
  - Folosind o pipetă multicanal, adăugați 60 μl de preamestec pentru a doua catenă la cei 20 μl de produs RT.
  - Amestecați prin pipetare în sus și în jos de 5 ori și centrifugați scurt într-o microcentrifugă.
3. Incubați în ciclul termic la 16°C timp de 1h (cu capacul deschis).

Treceți imediat la curățarea ADNc.





## 5.2.5. Curățarea ADNc

### MATERIALE

- Produs de sinteză ADNc a doua catenă în 80  $\mu$ l
- Bile magnetice AMPure<sup>®</sup> 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 120  $\mu$ l de bile magnetice AMPure<sup>®</sup> XP la 80  $\mu$ l de produs de sinteză ADNc pentru a doua catenă. 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 îndepărta lichidul de pe pereții eprubetei.
3. 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.

4. Eliminați cu grijă supernatantul cu ajutorul unei pipete multicanal.

**Țineți eprubetele pe suportul magnetic pentru următorii pași.**

5. Folosind o pipetă multicanal, adăugați 170  $\mu$ l 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 pașii 5 și 6 încă o dată.
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 acid nucleic recuperat.

**Scoateți eprubetele din suportul magnetic.**

10. Folosind o pipetă multicanal, adăugați 53  $\mu$ l de IDTE la bilele magnetice pentru a elua ADNc.
11. Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori și centrifugați scurt.
12. Incubați la temperatura camerei timp de 5 minute și centrifugați scurt, dacă este necesar, pentru a îndepărta lichidul de pe pereții eprubetei.
13. 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.
14. Transferați cu grijă 50  $\mu$ l de ADNc eluat în eprubetele nou etichetate de 0,2 ml de pe benzile de 8 eprubete.



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



## 5.2.6. Repararea capetelor și A-Tailing

### MATERIALE

- ADNc purificat în 50 µl fiecare
- Preamestec End Prep
- Benzi de 8 eprubete de 0,2 ml fără RNase/DNase

### PREGĂTIRE

- Programați ciclul termic pentru End Prep cu următoarele setări:

	TEMPERATURĂ (°C)	TIMP (MINUTE)
Capac	75	
Pasul 1	4	1
Pasul 2	20	30
Pasul 3	65	30
Menținere	4	∞

- Porniți programul End Prep. 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.**

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

NUMĂRUL DE REACȚII	8	16	24	32
<b>Bandă PCR (1 bandă)</b>	<b>4 eprubete</b>	<b>8 eprubete</b>	<b>8 eprubete</b>	<b>8 eprubete</b>
Preamestec End Prep (în µl)	22	22	33	44

2. Pregătiți reacția după cum urmează:
  - Folosind o pipetă multicanal, adăugați 10 µl de preamestec End Prep la 50 µl de probe ADNc (60 µl în benzi de 4 sau 8 eprubete).
  - Folosind o pipetă multicanal configurată la 40 µl, amestecați bine prin pipetări în sus și în jos de 5 ori și centrifugați scurt într-o microcentrifugă.
3. Introduceți în ciclul termic și continuați programul End Prep.

Treceți imediat la ligare.



## 5.2.7. Ligare

### MATERIALE

- Produse de reacție de reparare a capetelor și A-Tailing (ER&AT) în 60 µl fiecare
- Preamestec de ligare
- Stubby Universal Adapter
- Benzi de 8 eprubete de 0,2 ml fără RNase/DNase

### PREGĂTIRE

- În timpul incubării ER&AT, pregătiți noi benzi PCR cu 5 µl de Stubby Universal Adapter per eprubetă în funcție de strategia de indexare, conform următoarei scheme:

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

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

### PROCEDURĂ

1. 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 REACȚII	8	16	24	32
Bandă PCR (1 bandă)	4 eprubete	8 eprubete	8 eprubete	8 eprubete
Preamestec de ligare (în µl)	70	70	105	140

2. Folosind o pipetă multicanal, transferați 60 µl din fiecare produs de reacție ER&AT la benzile de 4 sau 8 eprubete care conțin 5 µl de Stubby Universal Adapter.
3. Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori și centrifugați scurt.
4. Folosind o pipetă multicanal, adăugați 31 µl de preamestec de ligare la fiecare produs de reacție ER&AT (96 µl în fiecare eprubetă a benzii de 4 sau 8 eprubete).
5. Folosind o pipetă multicanal configurată la 60 µl, amestecați bine prin pipetare de 10 ori în sus și în jos și centrifugați scurt.
6. Incubați în ciclul termic la 20 °C timp de 15 minute (cu capacul deschis).



Continuați cu curățarea post-ligare.



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

## 5.2.8. Curățarea post-ligare

### MATERIALE

- Produse ale reacției de ligare în 96  $\mu$ l fiecare
- Bile magnetice AMPure<sup>®</sup> XP echilibrate la temperatura camerei
- Etanol 80% proaspăt preparat
- Apă fără conținut de nuclează
- IDTE
- Benzi de 8 eprubete de 0,2 ml fără RNase/DNase

### PROCEDURĂ

1. Folosind o pipetă multicanal, adăugați 80  $\mu$ l de bile magnetice AMPure<sup>®</sup> XP la fiecare 96  $\mu$ l 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 dacă este necesar.
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  $\mu$ l de supernatant folosind o pipetă multicanal.

**Țineți eprubetele pe suportul magnetic pentru următorii pași.**

5. Folosind o pipetă multicanal, adăugați 170  $\mu$ l 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 pașii 5 și 6 încă o dată.
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  $\mu$ 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.



## 5.2.9. Amplificarea bibliotecii

### MATERIALE

- Produse ale reacției ligate și bile magnetice resuspendate în 20 μl de IDTE fiecare
- PCR Master Mix 2x
- Placă de primer cu index dublu unic 32 pentru Illumina\*

### 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	n cicluri*
Pasul 3: Aliniere	60	30	
Pasul 4: Extindere	72	30	
Pasul 5: Extindere finală	72	60	
Menținere	10	∞	

\* Urmați tabelul 2 (Secțiunea 5.2.1 Prepararea ARN total) pentru a determina numărul de cicluri PCR în funcție de calitatea ARN-ului și de cantitatea de material inițial.

### PROCEDURĂ

1. Pentru a facilita pipetarea, creați un rezervor de PCR Master Mix 2x prin adăugarea următoarelor volume la un nou set de benzi cu 4 sau 8 eprubete, în conformitate cu următoarea schemă:

NUMĂRUL DE REACȚII	8	16	24	32
Bandă PCR (1 bandă)	4 eprubete	8 eprubete	8 eprubete	8 eprubete
PCR Master Mix 2x (în μl)	60	60	90	120

2. Pregătiți reacția după cum urmează:

- Folosind o pipetă multicanal, adăugați 5 μl de primer cu index dublu unic diferit per eprubetă la produsele de ligare și la bilele magnetice, în conformitate cu strategia dvs. de indexare.



- Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori și centrifugați scurt.
- Folosind o pipetă multicanal, adăugați 25 μl de PCR Master Mix 2x la produsele de ligare și la bilele magnetice (25 μl în benzi de 4 sau 8 eprubete). Amestecați bine prin pipetare în sus și în jos de 10 ori și centrifugați scurt.

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



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

## 5.2.10. 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 dacă este necesar.
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 pașii 5 și 6 încă o dată.
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 îndepărta lichidul de pe pereții eprubetei.



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  $\mu$ l de supernatant (se recomandă transferul de două ori a 9  $\mu$ 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.

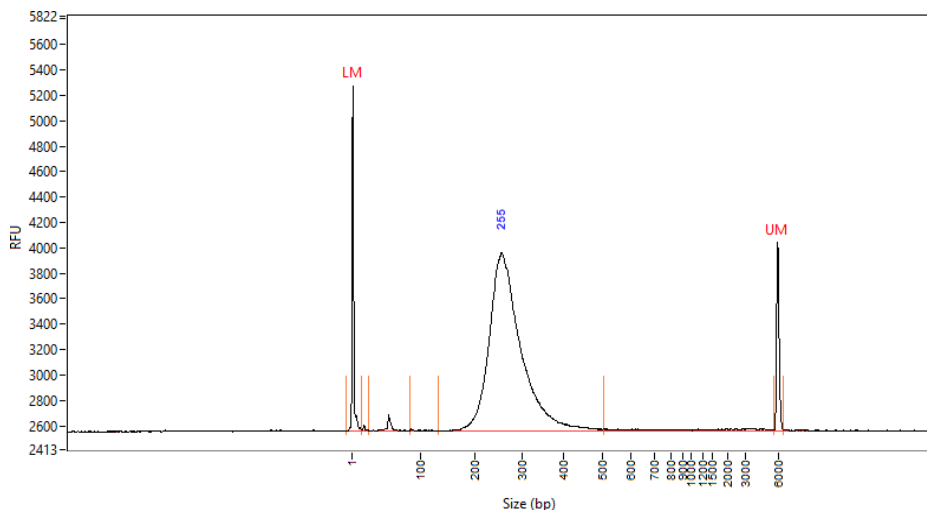
## 5.3. Cuantificarea bibliotecilor individuale și controlul calității

### 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  $\mu$ l de bibliotecă în 6  $\mu$ l de apă fără nuclează).
2. Cuantificați bibliotecile cu ajutorul unei metode fluorometrice (de exemplu, cuantificare Qubit HS utilizând 2  $\mu$ l din diluția 4x a bibliotecii menționată mai sus).
3. Efectuați controlul calității bibliotecilor prin analiza profilului acestora prin electroforeză capilară. Fragmentele de ADN din bibliotecă trebuie să aibă o distribuție a dimensiunii între 200bp și 800bp, cu un vârf clar în intervalul 200-400 bp.



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



## 5.4. Captură

### 5.4.1. Gruparea bibliotecilor pentru hibridizare și captură

#### 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	1	2	3	4
ADN Cot uman (în $\mu$ l)	5	11	16,5	22
Blocanți universali - Amestec TS (în $\mu$ l)	2	4,4	6,6	8,8

2. În cazul în care se efectuează două sau mai multe capturi, se pipetează 7  $\mu$ l din preamestecul de mai sus în eprubete individuale cu adsorbție redusă pentru ADN.
3. Adăugați un grup de 8 biblioteci individuale folosind 200 ng din fiecare (în total 1600 ng) per captură în eprubetele individuale care conțin preamestecul de mai sus.
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.

### 5.4.2. Hibridizarea

#### MATERIALE

- Biblioteci liofilizate
- 2X tampon de hibridizare
- Intensificator tampon de hibridizare
- Sonde ROS\_v1
- Apă fără conținut de nuclează
- 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





- Benzi de 8 eprubete de 0,2 ml fără RNase/DNase
- 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 4 și 6, 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 până la 16 ore.
7. Pregătiți în prealabil 1x soluții de lucru ale diferitelor tamponi 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	<b>330</b>
10x tampon de spălare II	22	198	<b>220</b>
10x tampon de spălare III	22	198	<b>220</b>
10x tampon de spălare stringentă	44	396	<b>440</b>
2x tampon de spălare bile magnetice	275	275	<b>550</b>



**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	<b>660</b>
10x tampon de spălare II	44	396	<b>440</b>
10x tampon de spălare III	44	396	<b>440</b>
10x tampon de spălare stringentă	88	792	<b>880</b>
2x tampon de spălare bile magnetice	550	550	<b>1100</b>



**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	<b>990</b>
10x tampon de spălare II	66	594	<b>660</b>
10x tampon de spălare III	66	594	<b>660</b>
10x tampon de spălare stringentă	132	1188	<b>1320</b>
2x tampon de spălare bile magnetice	825	825	<b>1650</b>



**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 4 REACȚII

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



**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.

### 5.4.3. 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.

1. Amestecați bilele magnetice prin agitare cu vortex timp de 15 secunde.
2. Transferați 100  $\mu$ l de bile magnetice pentru fiecare captură (200  $\mu$ l pentru 2 reacții, 300  $\mu$ l pentru 3 reacții, 400  $\mu$ l 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  $\mu$ l de 1x tampon de spălare a bilelor magnetice pentru fiecare captură (400  $\mu$ l pentru 2 reacții, 600  $\mu$ l pentru 3 reacții, 800  $\mu$ l 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  $\mu$ l de 1x tampon de spălare a bilelor magnetice pentru fiecare captură (200  $\mu$ l pentru 2 reacții, 300  $\mu$ l pentru 3 reacții, 400  $\mu$ l pentru 4 reacții) în eprubetă. Agitați cu vortex timp de 10 secunde.
8. Transferați 100  $\mu$ l 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.

### 5.4.4. 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 ciclorul termic, centrifugați scurt eprubeta (eprubetele) și puneți-le înapoi în ciclorul termic.
2. Introduceți eprubetele cu bile magnetice de streptavidină spălate în ciclorul 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.

## 5.4.5. 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



**Asigurați-vă că temperatura rămâne aproape de 65 °C pentru pașii 1-7**

**Notă: dacă lucrați cu 2 sau mai multe eprubete de captură, 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 absorbție redusă pentru ADN. Dacă lucrați cu două sau mai multe eprubete de captură, 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. Așezați eprubeta pe un suport magnetic și lăsați-o 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.



## 5.5. Amplificarea post-captură

### MATERIALE

- Suspensie de bile magnetice de streptavidină/apă fără conținut de nuclează (20 µl)
- Post Capture PCR Master Mix 2X
- Post Capture Illumina® Primers Mix
- Amplificator PCR
- Apă fără conținut de nuclează

### PREGĂTIRE

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

	TEMPERATURĂ (°C)	TIMP (SECUNDE)	
Capac	99	-	15 cicluri
Pasul 1: Denaturarea inițială	98	120	
Pasul 2: Denaturare	98	20	
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
Post Capture PCR Master Mix 2X (în µl)	25	55	82,5	110
Post Capture Illumina® Primers Mix (în µl)	2,5	5,5	8,25	11
Intensificator PCR (în µl)	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.

## 5.6. 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 îndepărta lichidul de pe pereții eprubetei.
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 eprubeta (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 îndepărta lichidul de pe pereții eprubetei.





11. Așezați eprubeta (eprubetele) pe un suport magnetic timp de 5 minute sau până când lichidul devine transparent.
12. Transferați cu grijă 18  $\mu$ l de supernatant (se recomandă transferul de două ori a 9  $\mu$ 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.

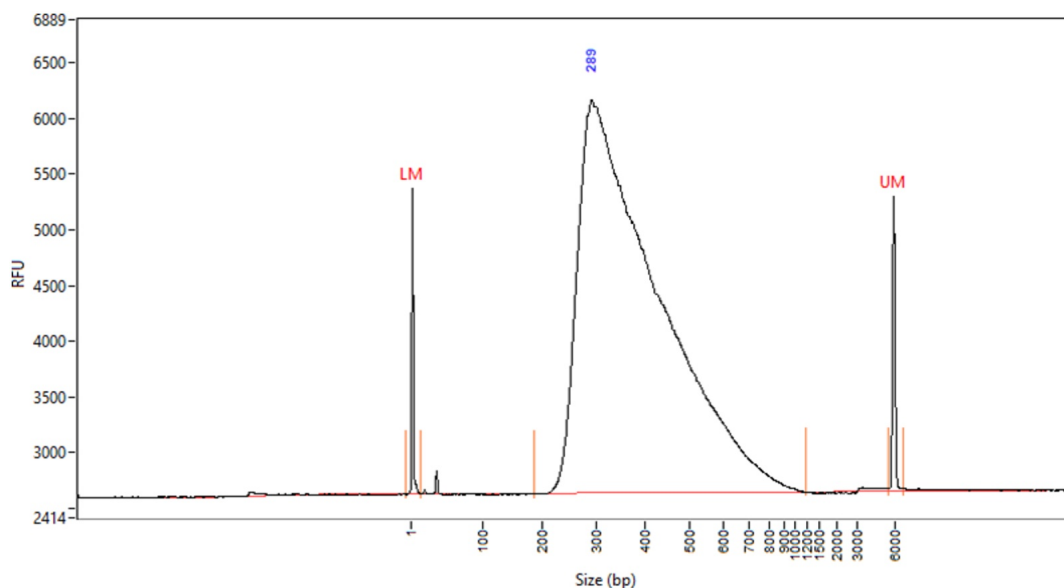
## 5.7. Cuantificarea finală a bibliotecii și controlul calității

### MATERIALE

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

### PROCEDURĂ

1. Cuantificați fiecare grup de biblioteci capturat cu o metodă fluorometrică (de exemplu, cuantificarea Qubit HS folosind 2  $\mu$ l din bibliotecă).
2. Controlați calitatea grupului de biblioteci prin analizarea profilului acestora prin electroforeză capilară. Fragmentele de ADN din bibliotecă trebuie să aibă o distribuție a dimensiunii între 200bp și 800bp, cu un vârf clar în intervalul 200-400 bp.



Exemplu de distribuție a dimensiunii grupului de biblioteci post-captură obținută cu sistemul de electroforeză capilară Agilent Fragment Analyzer™. LM se referă la markerul inferior, UM se referă la markerul superior.



## 5.8. Pregătirea bibliotecii pentru secvențiere

### MATERIALE

- Illumina® NextSeq® 550 Mid-Output Kit v2.5 (300 cicluri)
- 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 5.7, 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 capturat la 4 nM.
3. În cazul procesării mai multor grupuri de secvențiere, amestecați-le în cantități egale (de exemplu, 5 μl din fiecare) conform tabelului de recomandări de secvențiere de mai jos:

TIP KIT SISTEM NEXTSEQ 550	MAXIMUM PROBE PER RULARE
Randament mediu	Până la 86

4. Amestecați bine și utilizați această diluție în conformitate cu recomandările Illumina® privind denaturarea standard.
5. Pentru diluția de încărcare, consultați tabelul de mai jos:

TIP KIT SISTEM NEXTSEQ 550	DILUȚIE DE ÎNCĂRCARE
Randament mediu	1,3 pM
[Ajustați diluția (intervalul 1,1 pM - 1,5 pM) în funcție de numărul de clustere obținute în prima rulare]	

6. Pentru citirile recomandate pe probă, consultați tabelul de mai jos:

LUNGIMEA CITIRII (ÎN BP)	NUMĂR TOTAL RECOMANDAT DE CITIRI PER PROBĂ	NUMĂR RECOMANDAT DE PERECHI DE CITIRI (FRAGMENTE) PER PROBĂ
2 X 150	3 milioane	1,5 milioane



## 6. PROCEDURA DE ANALIZĂ

### 6.1. Demultiplexarea datelor NGS

Utilizatorul trebuie să efectueze demultiplexarea datelor NGS urmând instrucțiunile furnizate de ghidul de utilizare al secvențiatorului Illumina® NextSeq® 550 (NextSeq 550 Systems Guide, Document # 15069765 v07). După cum indică Illumina®, demultiplexarea autonomă pentru analizele terților poate fi efectuată cu bcl2fastq v2.0 sau o versiune mai recentă (bcl2fastq2 Conversion Software v2.20 Software Guide, Document #15051736 v03).



**Notă: Utilizatorii trebuie să rețină că utilizarea opțiunii de tip no-lane-splitting în bcl2fastq sau utilizarea altor fluxuri automate de demultiplexare poate genera nume de fișiere incompatibile cu modulul SOPHiA DDM™ Dx. Vă rugăm să consultați Manualul de utilizare al modulului SOPHiA DDM™ Dx pentru instrucțiuni clare.**

### 6.2. Încărcarea și analiza datelor

Utilizatorul se conectează în modul SOPHiA DDM™ Dx și selectează SOPHiA DDM™ Dx RNAtarget Oncology Solution în fereastra „My product(s)”, pentru a iniția încărcarea datelor NGS. Pentru a crea o nouă cerere pentru o analiză genomică, consultați secțiunea „Crearea unei cereri de analiză” din Manualul de utilizare a modulului SOPHiA DDM™ Dx pentru instrucțiuni suplimentare. După finalizarea analizei, utilizatorii vor primi o notificare prin e-mail. În cazul în care o notificare nu este primită în termen de 24 de ore de la inițierea procesului de încărcare a datelor, utilizatorii trebuie să contacteze echipa de asistență.



**Notă: Toate probele din cererea de analiză trebuie să fi fost procesate în cadrul aceleiași rulări de secvențiere și preparate cu aceiași reactivi de analiză.**

### 6.3. Generarea raportului

După ce fișierele de secvențiere (FASTQ) sunt încărcate cu succes, progresul analizei poate fi monitorizat în widgetul „Cererile mele de analiză genomică” din tabloul de bord sau din browser. Odată finalizat, raportul SOPHiA DDM™ Dx ROS generat pentru fiecare probă din cerere poate fi accesat și descărcat în format PDF. Manualul de utilizare a modulului SOPHiA DDM™ Dx poate fi utilizat pentru a obține instrucțiuni detaliate privind analiza.



Figura 2. Exemplu de raport SOPHiA DDM™ Dx ROS cu primul rezultat posibil al testului, a se vedea **Tabelul 3**.

## CE-IVD Report

2022, Mar 18

### SOPHiA DDM Dx RNAtarget Oncology Solution Report

Patient ID  
**patient1**

Sample ID  
**Sample name 1**

#### // Analysis

Request name  
**My super run**

CE-IVD Product  
**SOPHiA DDM Dx RNAtarget Oncology Solution**

SOPHiA DDM Dx version  
**0.0.0**

#### // Quality metrics for genomic sample

Control gene coverage  
**948.0**

Quality status  
**PASS**

#### // Detected fusions

Detected fusions  
**FGFR4(NM\_001291980;ex1)::ARHGAP4(NM\_001164741;ex2)**

#### Signature

#### // Intended purpose

SOPHiA DDM Dx RNAtarget Oncology Solution (ROS, "the Product") is intended to be used to identify clinically relevant gene fusions involving the genes ALK, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, NRG1, NTRK1, NTRK2, NTRK3, RET and ROS1, and exon-skipping events in EGFR and MET in RNA extracted from FFPE samples of patients with diagnosed lung cancer by targeting specific transcripts. The function of the Product is to provide an aid to healthcare professionals to make clinical decision(s) related to gene fusions / exon skipping events and to provide molecular rationale for the appropriate disease management strategy.  
The Product is a semi-automated, qualitative device intended to be used as an in-vitro diagnostic for professional use only.

Request number: 12345

Patient ID: patient1

1 / 1

Report date: 2022, Mar 18 10:03:12 UTC+01:00

Sample ID: Sample name 1



Se afișează Raportul SOPHiA DDM™ Dx ROS: SOPHiA DDM™ Dx ROS a detectat fuziuni și/sau evenimente de exon-skipping, scorul de calitate a probei și starea calității probei. Tabelul 3 de mai jos oferă o prezentare generală a rezultatelor posibile.

**Tabelul 3. Prezentare generală a rezultatelor posibile ale testului SOPHiA DDM™ Dx ROS**

SOPHiA DDM™ Dx ROS a detectat fuziuni/evenimente de exon-skipping	Scor de calitate	Starea calității	Descriere
Pozitiv	≥50	Acceptat	Detectare pozitivă de mare încredere.
Pozitiv	<50	Avertisment	Detectare pozitivă de mare încredere cu un avertisment. Risc crescut ca fuziunile suplimentare din probă să nu fie detectate. AVERTISMENT privind starea calității probei, deoarece pragul scorului de calitate (acoperirea genelor de control) nu este atins.
Negativ	≥50	Acceptat	Detectare negativă cu încredere ridicată.
Negativ (neconcludent)	<50	Avertisment	Detectare negativă cu avertisment. Risc crescut de fals negativ și rezultat neconcludent. AVERTISMENT privind starea calității probei, deoarece pragul scorului de calitate (acoperirea genelor de control) nu este atins.



## 7. DESCRIEREA ȘI PARAMETRII ANALIZEI

### 7.1. Fișiere de resurse

Alinierea se realizează față de genomul de referință GRCh37 (denumit și hg19). Sursele disponibile public pentru toate aceste cerințe pot fi găsite la adresa:

GRCh37 - genom de referință hg19:

[https://storage.googleapis.com/genomics-public-data/references/b37/Homo\\_sapiens\\_assembly19.fasta.gz](https://storage.googleapis.com/genomics-public-data/references/b37/Homo_sapiens_assembly19.fasta.gz)

Conversia coordonatelor genomice în etichete de gene și intervale genomice (pentru gene, transcrieri și exoni) este realizată utilizând o bază de date internă de transcrieri generată la data de 23 august 2016, folosind versiunea RefSeq disponibilă între versiunea RefSeq 77 și versiunea 78.

### 7.2. Gene țintă

Țintele cuprind un set de transcrieri cu relevanță clinică ridicată în tumorile pulmonare avansate. În mod specific, produsul SOPHiA DDM™ Dx ROS vizează exoni despre care se știe că sunt implicați în rearanjamente patologice: evenimente de exon-skipping (MET ex14, EGFRvIII) sau fuziuni (ALK, FGFR1-4, NRG1, NTRK1-3, RET, ROS1). Lista completă a exonilor vizați pentru detectarea fuziunilor genice este prezentată în Tabelul 4 de mai jos (**numerele negre**). Exonii care nu sunt vizați în mod specific, dar pentru care fuziunile nu ar fi excluse din raport dacă ar fi detectate, sunt de asemenea incluși în tabel (**numerele roșii**).

Tabelul 4. Lista exonilor implicați în evenimentele de fuziune genică detectate de SOPHiA DDM™ Dx ROS

Simbol genă	Exoni permiși atunci când gena este partenerul 5'	Exoni permiși atunci când gena este partenerul 3'	ID transcriere Refseq
ALK	NA	2,3,4,5,6-9,10,11-15,16-20,21-29	NM_004304
FGFR1	1,2,3-8,9-11,12,13,14,15-18	2-6,7,8-10,11,12,13,14-16,17,18	NM_023110
FGFR2	1,2,3-5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18	2,3,4,5,6-9,10,11,12,13,14-17,18	NM_000141
FGFR3	2,3,4,5,6,7-12,13,14,15,16,17,18	4,5,6-9,10,11,12,13-17,18	NM_000142
FGFR4	2,3-6,7,8-10,11,12-15,16,17,18	2,3-6,7,8-17,18	NM_213647
NRG1	NA	2,3,4,5,6,7,8,9-12	NM_013964
NTRK1	NA	7-13,14-17	NM_002529
NTRK2	NA	9,10,11-13,14,15,16,17,18-21	NM_006180
NTRK3	NA	7,8-11,12,13,14,15,16,17,18-20	NM_001012338
RET	NA	2,3-10,11,12,13-16,17,18-20	NM_020975
ROS1	NA	32-36,37-42,43	NM_002944



**negru** = exoni țintă pentru care fuziunile pot fi detectate și vor fi raportate;

**roșu** = exoni care nu sunt vizați, dar pentru care fuziunile vor fi totuși raportate dacă sunt detectate.

## 7.3. Preprocesarea datelor brute

### 7.3.1. Preprocesare

În etapele inițiale ale prelucrării datelor, fișierele fastq.gz sunt trunchiate la o dimensiune maximă de 200 MB. Dimensiunea fișierului original și dimensiunea după trunchiere sunt raportate în raportul QA. În continuare, metricile privind calitatea datelor sunt colectate pe baza fișierelor fastq după trunchiere.

### 7.3.2. Aliniere

Citirile sunt aliniate cu STAR-2.7.0f\_0328 folosind setări single-end. Sunt generate următoarele fișiere:

- a. Fișier bam principal: Conține toate citirile care acoperă o singură locație din genom (adică fără puncte de ruptură) sau care acoperă mai multe locații într-un mod liniar, corespunzător unui eveniment de splicing. Acest fișier este utilizat pentru detectarea omiterii exonului (exon-skipping).
- b. Fișier de joncțiuni chimerice: Conține citirile care acoperă două sau mai multe locații din genom, dar care nu se aliniază într-un mod liniar, corespunzător unui eveniment de splicing. Deoarece acestea sunt tipurile de citiri implicate în mod tipic într-o rearanjare, acest fișier este utilizat pentru detectarea fuziunilor. Pentru o descriere mai detaliată a unei alinieri chimerice, utilizatorul poate consulta (Dobin et al., 2013)<sup>4</sup>.

## 7.4. Lista modulelor incluse

Rezultatele returnate de pipeline-ul analitic în raportul IVD sunt detectări de fuziuni și/sau detectări de exon-skipping și un indicator de calitate pentru fiecare probă.

### 7.4.1. Modul de detectare a fuziunii genice/a evenimentelor de exon-skipping:

#### Detectarea fuziunii și a omiterii exonului (exon-skipping)

Modulul de detectare a fuziunilor și a evenimentelor de exon-skipping include algoritmi care aplică teste statistice pentru a identifica evenimente relevante din citiri aliniate chimeric, funcții de cuantificare și funcții de filtrare. Modulul execută următorii pași:

- a. Identificarea fuziunilor candidate din fișierul de joncțiuni chimerice generat de STAR. Fuziunile candidate care implică ARN-uri necodante sau două regiuni din aceeași genă nu vor fi luate în considerare pentru analiza ulterioară.
- b. Identificarea evenimentelor candidate de exon-skipping din fișierul bam principal prin examinarea dovezilor de exon-skipping în alinieri.



- c. Evaluarea probabilității ca un candidat să fie un eveniment adevărat de fuziune/exon-skipping. Modelul statistic utilizat ia în considerare următoarele:
- Tipul de punct de ruptură (relevant numai pentru fuziuni). De exemplu, într-o fuziune tipică în care punctul de ruptură este intronic pentru ambii parteneri, tipul de punct de ruptură va fi intron-intron. Alte tipuri ar putea fi exon-intron sau exon-exon. Fuziunile în care punctul de ruptură se află în mijlocul unui exon sunt penalizate și necesită suport molecular suplimentar pentru a fi considerate de încredere ridicată, deoarece aceste tipuri de evenimente sunt rare.
  - Poziția de mapare a citirilor (relevantă numai pentru fuziuni). De exemplu, într-o fuziune tipică în care punctul de ruptură este intronic pentru ambii parteneri, citirile se vor mapa la limitele exon-intron ale ambilor parteneri. În acest caz, poziția de mapare va fi exon-exon. Alte tipuri de poziții de mapare ar putea fi exon-intron sau intron-intron.
  - Numărul de molecule care susțin evenimentul.
  - Consecința codantă prezisă.

În unele cazuri, o pereche de gene de fuziune poate avea fuziuni multiple numite cu puncte de ruptură diferite. În acest caz, vor fi raportate fuziuni multiple.

## Filtrarea și raportarea fuziunii și a exon-skipping

Lista de fuziuni returnată în etapa de identificare poate conține detectări cu încredere scăzută generate de artefacte din date, evenimente cu suport molecular insuficient sau detectări cu încredere ridicată care nu sunt susținute de domeniul de aplicare al produsului. Orice fuziuni care îndeplinesc următoarele criterii sunt considerate de încredere scăzută și nu vor apărea în raportul IVD:

- a. Detectări de fuziuni în care ambii parteneri sunt adnotați ca aparținând aceleiași familii de gene pe baza adnotării HGNC.
- b. Detectări de fuziuni în care ambii parteneri au un grad ridicat de omologie, dar nu sunt adnotați ca făcând parte din aceeași familie de gene. Homologia este definită ca o aliniere BLAST între gena 5' și gena 3', care produce o valoare E mai mare de 50.
- c. Detectări de fuziuni în care cel puțin un partener este o pseudogenă.
- d. Detectări de fuziuni în care perechea de gene este adnotată în HGNC ca fiind de tip locus „readthrough”.
- e. Detectări de fuziuni sau de exon-skipping cu mai puțin de 10 molecule de suport.
- f. Detectări de fuziuni în care genele 5' și 3' sunt suprapuse.
- g. Detectări de fuziuni în care secvența intronică face parte din transcrierea de fuziune matură.

**În plus, pentru ca o fuziune să fie raportată, cel puțin un partener trebuie să fie menționat în Tabelul 4** (cu ID-ul transcrierii corespunzător, orientarea în cadrul fuziunii și exonul care delimitează punctul de ruptură).

Vă rugăm să rețineți:

- a. Exonii partener evidențiați cu roșu în Tabelul 4 nu sunt țintiți de test, dar pot fi totuși detectați (de exemplu, dacă un exon adiacent este țintit).
- b. Coordonatele genomice, în loc de simbolurile genelor, vor fi afișate pentru genele care nu sunt prezente în Tabelul 1 (care enumeră genele relevante din punct de vedere clinic).





Vor fi raportate numai următoarele evenimente de exon-skipping: EGFR 1-8 (NM\_005228), EGFR 1-9 (NM\_005228) și MET 13-15 (NM\_001127500).

## 7.4.2. Indicator de calitate

Pentru fiecare probă analizată se calculează următorul indicator:

- Acoperirea genei de control: această valoare reprezintă acoperirea moleculară calculată a unei gene de control intern. Deoarece se așteaptă ca gena de control selectată să fie bine exprimată în diferite tipuri de țesuturi, această măsurătoare este utilizată ca indicator al ratei de conversie a ARN-ului, adică eficiența cu care moleculele de ARN disponibile în probă sunt convertite în fragmente care pot fi secvențiate și utilizate pentru analiză.
- Probele care prezintă o acoperire moleculară sub 50x sunt considerate ca având o calitate suboptimală a datelor și sunt etichetate cu Starea calității „WARNING” (Avertisment) în raportul SOPHiA DDM™ Dx ROS. Acest statut indică faptul că doar un număr mic de molecule unice au fost secvențiate, posibil din cauza calității scăzute a materialului de intrare sau a unor probleme tehnice legate de executarea fluxului de lucru. Calitatea insuficientă a datelor poate afecta puterea de detectare a evenimentelor de fuziune sau de omitere a exonului. Acoperirea de 50x sau mai mare este asociată cu statutul de calitate „PASS” (Acceptat). A se vedea Secțiunea 6.3 pentru detalii suplimentare.



## 8. EVALUAREA PERFORMANȚEI

### 8.1. Evaluarea performanțelor analitice

#### 8.1.1. Concordanța statutului de fuziune / exon-skipping cu testul NGS comparator

Performanța analitică a detecției fuziunilor/evenimentelor de exon-skipping a fost evaluată utilizând 50 ng de ARN derivat din 54 de probe clinice FFPE, incluzând 40 de probe de tumori pulmonare și 14 provenite din alte tumori solide. Statutul acestor probe a fost predeterminat cu ajutorul metodei (metodelor) NGS alternative și comparat cu rezultatul SOPHiA DDM™ Dx ROS.

Probe	Măsurarea performanței	Observate	limita inferioară a intervalului de încredere de 95%
În general (n=54)	<b>Acord procentual pozitiv</b>	100%	88,65%
	<b>Acord procentual negativ</b>	100%	99,99%
	<b>Acord procentual global</b>	100%	NA
Numai plămâni (n=40)	<b>Acord procentual pozitiv</b>	100%	79,61%
	<b>Acord procentual negativ</b>	100%	99,99%
	<b>Acord procentual global</b>	100%	NA

#### 8.1.2. Limita de detecție pentru fuziuni / evenimente de exon-skipping

Limita de detecție (LoD) a fost estimată utilizând diluții ale unei probe de referință care conține 14 rearanjamente țintite și o probă clinică, ambele cu un număr cunoscut de molecule de fuziune / exon-skipping. Au fost utilizați 50 ng de ARN total ca material de intrare. Limita de detecție (LoD) a fost măsurată ca fiind cel mai mic număr de molecule de fuziune prezente în materialul de intrare la care sensibilitatea a atins  $\geq 95\%$ , cu un interval de încredere de 95%.

Eveniment	LoD [molecule/50 ng de ARN]
FGFR3-BAIAP2L1	280
EML4-ALK	303
EGFRVIII	258
CCDC6-RET	335



Eveniment	LoD [molecule/50 ng de ARN]
METex14	240
ETV6-NTRK3	296
CD74-ROS1	677
KIF5B-RET	78
LMNA-NTRK1	371
FGFR3-TACC3	69
SLC34A2-ROS1	187
NCOA4-RET	241
TFG-NTRK1	369
TPM3-NTRK1	213
CD74-NRG1	357*

\*fuziune evaluată într-o probă clinică

### 8.1.3. Repetabilitatea statutului de fuziune/exon-skipping

Repetabilitatea a fost evaluată prin măsurarea acordului procentual pozitiv (PPA) / acordului procentual negativ (NPA) într-un experiment care a inclus 32 de replici ale unei probe de referință diluate, care conținea 14 rearanjări țintite, astfel încât diferite evenimente au fost prezente la aproximativ 0,9-6 ori limita de detecție (LoD). Repetabilitatea de 100% a fost măsurată pentru toate cele 13 evenimente prezente peste limita lor de detecție.

## 8.2. Evaluarea performanțelor clinice

Performanța clinică a soluției SOPHiA DDM™ Dx RNAtarget Oncology Solution a fost stabilită într-un studiu clinic pe 22 de probe de ARN izolate din probe de tumori pulmonare FFPE. Statutul clinic (adică pozitiv sau negativ pentru fuziune/exon-skipping) pentru fiecare probă a fost predeterminat utilizând metoda NGS validată extern. 50 ng de ARN au fost procesați cu SOPHiA DDM™ Dx ROS de către un centru extern, iar statusul determinat a fost comparat cu statusul pre-determinat.

Metric	Valoare (95% C.I.)
Sensibilitate diagnostică	100% [70,09%-100%]
Specificitate diagnostică	100% [77,19%-100%]



## 9. AVERTISMENTE, MĂSURI DE PRECAUȚIE ȘI LIMITĂRI

### 9.1. Avertismente generale

- Numai pentru diagnosticarea in vitro. 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.
- SOPHiA DDM™ Dx ROS a fost validat pentru probe de ARN FFPE provenite din cancer pulmonar (input de 50 ng), cu DV200 ≥ 20% (măsurat utilizând sistemul Agilent Fragment Analyzer™) și conținut tumoral ≥ 20% (determinat prin metode standard de anatomie patologică), secvențiate pe platforma Illumina® NextSeq® 550 (flow cell Mid-Output).
- Calitatea slabă a datelor brute NGS poate afecta analiza datelor și cauza rezultate fals pozitive, fals negative și neconcludente.
- Dacă se modifică orice parte a manipulării, protocolului, secvențiatorului, multiplexării etc., analizele nu sunt acoperite de instrucțiunile de utilizare descrise.
- Pentru a preveni contaminarea probelor, trebuie definite spații separate fizic pentru etapele pre-PCR și post-PCR. Utilizați întotdeauna reactivi proaspeți, ARN corect extras și depozitat. Pentru detalii privind calitatea și integritatea ARN-ului, consultați IFU Secțiunea 5.3.1 Prepararea ARN total.
- Pentru efectuarea experimentului, trebuie utilizate pipete corect calibrate și echipamente de laborator adecvate.
- Nu trebuie amestecate loturi diferite de reactivi.
- Dimensiunea maximă de rulare care poate fi încărcată pentru acest produs este de 75 Gb. Pipeline-ul analitic poate procesa probe individuale cu până la 1 Gb de date. Volumele mai mari per probă pot cauza disfuncționalitatea pipeline-ului.
- Pentru instrucțiuni detaliate privind software-ul, consultați manualul de utilizare al modului SOPHiA DDM™ Dx.

### 9.2. Măsuri generale de precauție

- A se utiliza numai cu kitul SOPHiA GENETICS™ Dx RNA Library Prep Kit IV.
- Pentru utilizarea IVD numai cu modul SOPHiA DDM™ Dx.
- Nu utilizați kituri, reactivi sau articole de unică folosință după data expirării.
- Toate materialele biologice și substanțele chimice sunt potențial periculoase. Deși este puțin probabil ca materialul de probă FFPE și acizii nucleici preparați din acesta să prezinte un pericol infecțios, utilizatorul trebuie să respecte întotdeauna procedurile locale de sănătate și siguranță.



- Specimenele trebuie manipulate ca fiind infecțioase, utilizând proceduri de laborator sigure, precum cele descrise în documentul CLSI M29-A4<sup>5</sup>.
- Depozitați și manipulați reactivii în conformitate cu instrucțiunile de pe cutiile kitului și nu îi utilizați dacă au expirat.
- Unii reactivi pot necesita măsuri de precauție. Pentru informații specifice privind siguranța, consultați fișele cu date privind siguranța materialelor (MSDS) corespunzătoare, furnizate pentru fiecare componentă a produsului.
- Eliminați reactivii neutilizați, kiturile, accesoriile și deșeurile în conformitate cu reglementările locale.
- 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, probele de intrare în afara intervalului de criterii recomandate: Cantitatea de ARN, conținutul tumoral și DV200) ar putea duce la rezultate compromise în ceea ce privește performanța analitică a testului. SOPHiA GENETICS™ nu își asumă răspunderea pentru rezultatele și deciziile luate pe baza acestor rezultate.
- Se recomandă păstrarea ARN purificat în soluție tamponată compusă din 10 mM Tris pH 7,5 sau 8,0 și 0,1 mM EDTA.

### 9.3. Limitări generale

- Multiplexarea pentru a obține un număr mediu de citiri per probă într-o rulare mai mică de 3 milioane de citiri (1,5 milioane de fragmente) poate afecta negativ performanța produsului.
- Absența unui eveniment de fuziune/exon-skipping în raport nu exclude prezența unui astfel de eveniment prezent sub limitele de detecție ale testului. Pentru mai multe detalii privind limita de detecție, consultați Secțiunea 9.3.1.
- Cantitatea maximă de date per fișier fastq.gz (sau patru seturi de fișiere în cazul intrărilor cu bandă divizată) este limitată la 200 mb, ceea ce corespunde la 4,5-5M citiri per probă. Fișierele mai mari de atât vor fi redimensionate (adică, citirile sunt efectuate până când se atinge dimensiunea maximă sau sfârșitul fișierului).
- Produsul nu detectează și nici nu raportează evenimentele de contaminare încrucișată a probelor.
- Produsul nu măsoară și nu raportează conținutul tumoral al probelor.
- Chiar și atunci când se respectă recomandările privind multiplexarea probelor și se atinge numărul mediu recomandat de 1,5 milioane de perechi de citiri per probă pentru o anumită secvențiere, adâncimea moleculei poate fi insuficientă pentru a furniza rezultate sensibile și precise din diverse motive, inclusiv: calitatea slabă a probelor și calitatea slabă a datelor NGS.
- Calitate scăzută, număr inegal de transcrieri țintă între probele combinate, alocare semnificativ inegală a citirilor între bibliotecile individuale sau combinate și cele capturate, alocare semnificativ inegală a citirilor între probele multiplexate în aceeași rulare, distribuție dezechilibrată a profunzimii citirilor pe panelul de gene (de exemplu, profunzime de citire constant mai mică în regiunile bogate în AT). De asemenea, este posibil ca bibliotecile derivate din probe de calitate slabă să consume mult mai puține citiri decât numărul mediu de citiri într-o rulare.



- Testul este capabil să detecteze fuziuni genice, definite ca transcrieri anormale care conțin exoni proveniți din două gene distincte, și în special joncțiuni exon-exon ale genelor de fuziune la nivel de mRNA, cu condiția ca exonul genei țintă primare implicat în fuziune să fie inclus în lista de ținte din Tabelul 4.
- Raportul SOPHiA DDM™ Dx ROS IVD furnizează simbolul genei, ID-ul transcrierii și exonii relevanți numai pentru fuziunile care implică genele enumerate în Tabelul 1.
- Toate fuziunile vor fi raportate cu condiția să îndeplinească restricțiile enumerate în Secțiunea 7.4.1 Modul de detectare a evenimentelor de fuziune genetică + exon-skipping - Filtrarea și raportarea fuziunii și a exon-skipping. Orice fuziuni în afara domeniului de aplicare al acestui produs nu vor fi raportate.
- Orice eveniment de exon-skipping, altul decât MET exon 14 și EGFRvIII, nu va fi raportat.
- Performanța de detectare a evenimentelor de fuziune/exon-skipping este asigurată atât timp cât calitatea datelor este suficientă, așa cum indică indicatorul de calitate (a se vedea Secțiunea 7.4.2). Absența evenimentelor raportate pentru probele cu o stare de calitate WARNING nu exclude prezența evenimentelor. Se raportează în continuare fuziuni cu încredere ridicată pentru astfel de probe.
- Fragmentarea materialului de intrare ar putea să nu reflecte gradul de deteriorare chimică a ARN-ului genomic. Se știe că deteriorarea chimică scade conversia ARN în ADNc și duce la o diversitate scăzută a moleculelor. Prin urmare, în unele cazuri, se pot obține date de calitate slabă pentru probe cu valori DV200 relativ ridicate (a se vedea Secțiunea 5.2.1).
- Performanțele reduse ale testului, în special rezultatele fals negative sau neconcludente, pot fi cauzate de: probleme în etapele de pregătire a probei sau de secvențiere, prezența evenimentelor sub limita lor de detecție, material de pornire insuficient (de exemplu, <50 ng), calitate scăzută a materialului de intrare, conținut tumoral scăzut, adâncime de secvențiere insuficientă, contaminare cu ADN (în special la un raport ADN:ARN de 4:1 sau mai mare), evenimente cu omologie ridicată a secvenței cu regiuni care nu sunt vizate, evenimente cu complexitate scăzută a secvenței sau limitări în proiectarea kitului.
- Diversitatea moleculară scăzută observată în datele obținute se reflectă, de obicei, printr-un randament redus al bibliotecii și poate fi cauzată de diverși factori, inclusiv material de intrare insuficient, fragmentare excesivă a materialului de intrare, degradare chimică accentuată a ARN-ului, contaminare cu RNases, prezența unor interferenți chimici, probleme în timpul pregătirii bibliotecii sau capturii, probleme de secvențiere sau adâncime de secvențiere insuficientă. Indicii de calitate slabă a datelor care pot fi observate:
  - a. Randament scăzut al bibliotecii – probele cu o concentrație a bibliotecii de cel puțin 25 ng/ml generează, în general, date de calitate suficientă, evaluată prin numărul de molecule ale genei de control; valorile mai mici pot indica probleme de calitate a probei sau probleme tehnice.
  - b. Randament scăzut al bibliotecii capturate – randamentele de capturare cu o concentrație de cel puțin 10 ng/ml indică, în general, executarea corectă a fluxului de lucru.
  - c. Număr scăzut de citiri – numărul de citiri semnificativ mai mic de 3M citiri per probă poate avea un impact negativ asupra performanței.
  - d. Probleme de secvențiere – parametrii de secvențiere sub valorile recomandate de Illumina® nu vor susține performanțele bune ale produsului.
- Evenimentele de fuziune și de exon-skipping necesită o cantitate suficientă de molecule inițiale pentru fuziune în probă. Evenimentele pot să nu fie detectate atunci când fuziunea este puțin sau deloc exprimată. Produsul este capabil să detecteze fuziuni/evenimente de exon-skipping numai dacă acestea sunt exprimate la un anumit nivel în orice probă dată, rezultând un număr suficient de molecule



disponibile pentru conversie. Vă rugăm să consultați limitele de detecție pentru evenimentele testate în Tabelul 5 de mai jos.

**Tabelul 5. Limita de detecție a fuziunilor genice/evenimentelor de exon-skipping (număr de molecule)**

Obiectivul principal	gena 5'	gena 3'	exon 5'	exon 3'	Limita de detecție [molecule]*
ALK	EML4	ALK	13	20	303
EGFR	EGFR	EGFR	1	8	258
FGFR3	FGFR3	TACC3	17	11	69
FGFR3	FGFR3	BAIAP2L1	17	2	280
MET	MET	MET	13	15	240
NRG1	CD74	NRG1	6	6	357
NTRK1	LMNA	NTRK1	2	11	371
NTRK1	TFG	NTRK1	5	10	369
NTRK1	TPM3	NTRK1	8	10	213
NTRK3	ETV6	NTRK3	5	15	296
RET	CCDC6	RET	1	12	335
RET	KIF5B	RET	24	11	78
RET	NCOA4	RET	7	12	241
ROS1	CD74	ROS1	6	34	677
ROS1	SLC34A2	ROS1	4	34	187

\* Limita de detecție a fost estimată utilizând numărul de molecule de fuziune din materialul de intrare, determinat fie prin PCR digital cu picături, fie pe baza valorilor declarate de producătorul materialului de referință utilizat. Valoarea reprezintă limita superioară a intervalului de încredere estimat de 95% pentru limita de detecție (LoD), asigurând o sensibilitate de 95%, calculată utilizând 5 diluții seriale, cu cel puțin 10 replici pentru fiecare diluție<sup>6</sup>.

- Detectarea fuziunilor a fost verificată cu probe clinice care prezintă un set divers, dar limitat de fuziuni. Nu toate probele testate au fost derivate din tumori pulmonare. Pentru o listă detaliată, vă rugăm să consultați Tabelul 6 de mai jos. Datorită numărului potențial mare de fuziuni posibile, nu se poate garanta că produsul va putea detecta eficient fuziunile care nu sunt incluse în această listă.

**Tabelul 6. Lista probelor utilizate pentru detectarea fuziunilor**



Obiectivul principal	gena 5'	gena 3'	exon 5'	exon 3'	Probe testate	Tipul probei
ALK	EML4	ALK	13	20	3	Cancer pulmonar, Adenocarcinom pulmonar, Probă de referință
ALK	EML4	ALK	2	20	1	Adenocarcinom pulmonar
ALK	EML4	ALK	6	20	1	Adenocarcinom pulmonar
ALK	PPFIBP1	ALK	12	20	1	Cancerul pulmonar
EGFR	EGFR	EGFR	1	8	2	Gliom, probă de referință
FGFR1	FGFR1	TACC1	17	5	1	Gliom
FGFR2	FGFR2	RBFOX3	17	5	1	Gliom
FGFR3	FGFR3	TACC3	17	11	5	Tumoră a tractului urinar, glioblastom, gliom, probă de referință
FGFR3	FGFR3	BAIAP2L1	17	2	1	Probă de referință
FGFR3	FGFR3	TACC3	17	8	2	Gliom
FGFR3	FGFR3	AGO3	7	12	1	Glioblastom
FGFR3	FGFR3	AGO3	8	12	1	Glioblastom
FGFR3	FGFR3	MYH14	17	24	1	Gliom
FGFR3	FGFR3	MYH14	18	24	1	Gliom
MET	MET	MET	13	15	4	Cancer pulmonar, Adenocarcinom pulmonar, Probă de referință
NRG1	CD74	NRG1	6	6	2	Cancerul pulmonar
NRG1	SLC3A2	NRG1	4	6	1	Cancerul pulmonar
NRG1	SLC3A2	NRG1	5	6	1	Cancerul pulmonar
NTRK1	LMNA	NTRK1	2	11	1	Probă de referință
NTRK1	TFG	NTRK1	5	10	1	Probă de referință
NTRK1	TPM3	NTRK1	8	10	1	Probă de referință
NTRK1	NOS1AP	NTRK1	10	10	1	Gliom
NTRK2	UBQLN1	NTRK2	1	14	1	Gliom
NTRK2	UBQLN1	NTRK2	1	16	1	Gliom
NTRK3	ETV6	NTRK3	5	15	1	Probă de referință
RET	CCDC6	RET	1	12	1	Probă de referință
RET	KIF5B	RET	24	11	1	Probă de referință





Obiectivul principal	gena 5'	gena 3'	exon 5'	exon 3'	Probe testate	Tipul probei
RET	NCOA4	RET	7	12	1	Probă de referință
RET	KIF5B	RET	15	12	1	Cancerul pulmonar
ROS1	CD74	ROS1	6	34	2	Adenocarcinom pulmonar, Probă de referință
ROS1	SDC4	ROS1	5	34	3	Cancerul pulmonar
ROS1	GOPC	ROS1	8	35	2	Glioblastom
ROS1	GOPC	ROS1	8	36	2	Glioblastom
ROS1	SDC4	ROS1	5	33	2	Cancerul pulmonar
ROS1	SLC34A2	ROS1	4	34	1	Probă de referință
ROS1	CD74	ROS1	6	33	1	Adenocarcinom pulmonar
ROS1	CD74	ROS1	6	35	1	Adenocarcinom pulmonar
ROS1	CD74	ROS1	6	36	1	Adenocarcinom pulmonar
ROS1	CD74	ROS1	6	43	1	Adenocarcinom pulmonar
ROS1	SDC4	ROS1	4	34	1	Cancerul pulmonar
ROS1	TPM3	ROS1	8	35	1	Cancerul pulmonar

- Algoritmul de detectare a fuziunilor a fost testat folosind secvențe generate in silico care corespund fuziunilor genice, pentru o listă restrânsă de fuziuni (Tabelul 7). Datorită numărului potențial mare de fuziuni posibile, nu se poate garanta că produsul va putea raporta corect fuziunile care nu sunt incluse în această listă. Fiecărei fuziuni i s-a atribuit probabilitatea de a fi detectată:
  - a. Ridicată: peste 90% dintre citirile simulate sunt atribuite fuziunii de către programul de identificare a fuziunilor.
  - b. Medie: între 60 și 90% dintre citirile simulate sunt atribuite fuziunii de către programul de detectare a fuziunilor.
  - c. Scăzută: sub 60% dintre citirile simulate sunt atribuite fuziunii de către programul de detectare a fuziunilor.

Eșecul de a atribui 100% din citiri fuziunii așteptate se observă în situațiile în care nu toate citirile au putut fi mapate cu succes la limita exon-intron. Motivele identificate pentru maparea nereușită includ complexitatea redusă a secvenței, prezența regiunilor homopolimerice lungi, prezența regiunilor repetitive și a secvențelor cu omologie ridicată față de regiunile nețintite.

**Tabelul 7. Probabilitatea de detectare a fuziunii genice**



Obiectivul principal	gena 5'	gena 3'	exon 5'	exon 3'	5' transcriere	3' transcriere	Probabilitatea de detectabilitate
ALK	ATIC	ALK	7	20	NM_004044	NM_004304	Ridicată
RET	CCDC6	RET	8	11	NM_005436	NM_020630	Ridicată
ALK	SEC31A	ALK	22	20	NM_001077207	NM_004304	Ridicată
ALK	TFG	ALK	5	20	NM_001007565	NM_004304	Ridicată
ALK	TPM3	ALK	10	20	NM_152263	NM_004304	Ridicată
RET	CCDC6	RET	8	12	NM_005436	NM_020630	Ridicată
ALK	TPR	ALK	15	20	NM_003292	NM_004304	Ridicată
FGFR1	TRIM24	FGFR1	11	9	NM_003852	NM_00117406	Ridicată
NTRK2	TRIM24	NTRK2	12	12	NM_003852	NM_00101806	Ridicată
RET	TRIM24	RET	9	12	NM_015905	NM_020630	Ridicată
NRG1	CD74	NRG1	6	4	NM_001025159	NM_00115999	Ridicată
RET	TRIM33	RET	11	12	NM_015906	NM_020630	Ridicată
RET	TRIM33	RET	16	12	NM_015906	NM_020630	Ridicată
RET	TRIM33	RET	17	11	NM_015906	NM_020630	Ridicată
ALK	VCL	ALK	13	20	NM_003373	NM_004304	Ridicată
ALK	VCL	ALK	16	20	NM_003373	NM_004304	Ridicată
ALK	VCL	ALK	6	20	NM_003373	NM_004304	Ridicată
FGFR1	ZMYM2	FGFR1	17	10	NM_001190964	NM_00117406	Ridicată
ROS1	CLIP1	ROS1	20	36	NM_001247997	NM_002944	Ridicată
ALK	CLTC	ALK	30	20	NM_001288653	NM_004304	Ridicată
ALK	CLTC	ALK	31	20	NM_001288653	NM_004304	Ridicată
ROS1	CLTC	ROS1	31	35	NM_001288653	NM_002944	Ridicată
FGFR1	CNTRL	FGFR1	37	8	NM_007018	NM_00117406	Ridicată



Obiectivul principal	gena 5'	gena 3'	exon 5'	exon 3'	5' transcriere	3' transcriere	Probabilitatea de detectabilitate
FGFR1	BCR	FGFR1	4	10	NM_004327	NM_00117406	Ridicată
ALK	DCTN1	ALK	13	20	NM_001135040	NM_004304	Ridicată
ALK	EML4	ALK	1	20	NM_001145076	NM_004304	Ridicată
ALK	EML4	ALK	12	20	NM_001145076	NM_004304	Ridicată
ALK	EML4	ALK	13	20	NM_001145076	NM_004304	Ridicată
ALK	EML4	ALK	14	20	NM_001145076	NM_004304	Ridicată
ALK	EML4	ALK	16	20	NM_001145076	NM_004304	Ridicată
ALK	EML4	ALK	17	20	NM_001145076	NM_004304	Ridicată
ALK	EML4	ALK	2	20	NM_001145076	NM_004304	Ridicată
FGFR1	BCR	FGFR1	4	8	NM_004327	NM_00117406	Ridicată
ALK	EML4	ALK	19	18	NM_001145076	NM_004304	Ridicată
ALK	EML4	ALK	19	20	NM_001145076	NM_004304	Ridicată
ALK	EML4	ALK	3	20	NM_001145076	NM_004304	Ridicată
NTRK3	EML4	NTRK3	1	14	NM_001145076	NM_00100715	Ridicată
RET	ERC1	RET	10	12	NM_001301248	NM_020630	Ridicată
RET	ERC1	RET	12	12	NM_001301248	NM_020630	Ridicată
RET	ERC1	RET	17	12	NM_001301248	NM_020630	Ridicată
RET	ERC1	RET	7	12	NM_001301248	NM_020630	Ridicată
ROS1	ERC1	ROS1	10	36	NM_001301248	NM_002944	Ridicată



Obiectivul principal	gena 5'	gena 3'	exon 5'	exon 3'	5' transcriere	3' transcriere	Probabilitatea de detectabilitate
ROS1	ERC1	ROS1	11	36	NM_001301248	NM_002944	Ridicată
FGFR3	ETV6	FGFR3	5	10	NM_001987	NM_000142	Ridicată
NTRK3	ETV6	NTRK3	3	14	NM_001987	NM_00100715	Ridicată
NTRK3	ETV6	NTRK3	4	14	NM_001987	NM_00100715	Ridicată
NTRK3	ETV6	NTRK3	4	15	NM_001987	NM_00101233	Ridicată
NTRK3	ETV6	NTRK3	5	15	NM_001987	NM_00101233	Ridicată
NTRK3	ETV6	NTRK3	5	20	NM_001987	NM_00101233	Ridicată
RET	ETV6	RET	5	12	NM_001987	NM_020630	Ridicată
FGFR1	FGFR1	PLAG1	1	2	NM_001174063	NM_002655	Ridicată
FGFR1	FGFR1	PLAG1	1	4	NM_001174063	NM_00111463	Ridicată
ALK	CARS	ALK	17	20	NM_001014437	NM_004304	Ridicată
NTRK2	FRMD3	NTRK2	1	12	NM_001244959	NM_00101806	Ridicată
RET	GOLGA5	RET	7	12	NM_005113	NM_020630	Ridicată
ROS1	GOPC	ROS1	3	36	NM_001017408	NM_002944	Ridicată
ROS1	GOPC	ROS1	4	36	NM_001017408	NM_002944	Ridicată
ROS1	GOPC	ROS1	7	35	NM_001017408	NM_002944	Ridicată
ALK	HIP1	ALK	21	20	NM_001243198	NM_004304	Ridicată
ALK	HIP1	ALK	26	20	NM_001243198	NM_004304	Ridicată
ALK	HIP1	ALK	28	20	NM_001243198	NM_004304	Ridicată
RET	HOOK3	RET	11	12	NM_032410	NM_020630	Ridicată



Obiectivul principal	gena 5'	gena 3'	exon 5'	exon 3'	5' transcriere	3' transcriere	Probabilitatea de detectabilitate
ALK	CARS	ALK	18	20	NM_001014437	NM_004304	Ridicată
ALK	KIF5B	ALK	15	20	NM_004521	NM_004304	Ridicată
ALK	KIF5B	ALK	17	20	NM_004521	NM_004304	Ridicată
RET	KIF5B	RET	1	11	NM_004521	NM_020630	Ridicată
RET	KIF5B	RET	14	12	NM_004521	NM_020630	Ridicată
RET	KIF5B	RET	15	11	NM_004521	NM_020630	Ridicată
RET	KIF5B	RET	15	12	NM_004521	NM_020630	Ridicată
RET	KIF5B	RET	16	12	NM_004521	NM_020630	Ridicată
RET	KIF5B	RET	22	12	NM_004521	NM_020630	Ridicată
RET	CCDC6	RET	1	11	NM_005436	NM_020630	Ridicată
RET	KIF5B	RET	23	12	NM_004521	NM_020630	Ridicată
RET	KIF5B	RET	24	11	NM_004521	NM_020630	Ridicată
FGFR2	KLK2	FGFR2	1	5	NM_001002231	NM_000141	Ridicată
FGFR2	KLK2	FGFR2	3	5	NM_001002231	NM_000141	Ridicată
RET	KTN1	RET	29	12	NM_001079521	NM_020630	Ridicată
ROS1	LRIG3	ROS1	16	35	NM_001136051	NM_002944	Ridicată
ALK	MSN	ALK	11	20	NM_002444	NM_004304	Ridicată
RET	NCOA4	RET	6	12	NM_001145260	NM_020630	Ridicată
RET	NCOA4	RET	7	12	NM_001145260	NM_020630	Ridicată
RET	CCDC6	RET	1	12	NM_005436	NM_020630	Ridicată
FGFR4	NSD1	FGFR4	2	7	NM_022455	NM_00129198	Ridicată
RET	PCM1	RET	29	12	NM_001315507	NM_020630	Ridicată
RET	PCM1	RET	31	17	NM_001315507	NM_020630	Ridicată
ALK	PPFIBP1	ALK	12	20	NM_003622	NM_004304	Ridicată



Obiectivul principal	gena 5'	gena 3'	exon 5'	exon 3'	5' transcriere	3' transcriere	Probabilitatea de detectabilitate
ALK	PPFIBP1	ALK	6	20	NM_001198915	NM_004304	Ridicată
ROS1	PPFIBP1	ROS1	6	35	NM_001198915	NM_002944	Ridicată
RET	CCDC6	RET	2	12	NM_005436	NM_020630	Ridicată
ROS1	PWWP2A	ROS1	1	36	NM_001130864	NM_002944	Ridicată
NTRK2	QKI	NTRK2	6	12	NM_001301085	NM_00101806	Ridicată
ALK	RNF213	ALK	20	20	NM_001256071	NM_004304	Ridicată
ROS1	SDC4	ROS1	2	35	NM_002999	NM_002944	Ridicată
ALK	SEC31A	ALK	20	20	NM_001077206	NM_004304	Ridicată
ALK	TFG	ALK	4	20	NM_001007565	NM_004304	Ridicată
RET	NCOA4	RET	8	11	NM_001145260	NM_020630	Ridicată
RET	NCOA4	RET	8	12	NM_001145260	NM_020630	Ridicată
ROS1	TFG	ROS1	4	35	NM_001007565	NM_002944	Ridicată
ALK	MSN	ALK	10	20	NM_002444	NM_004304	Mediu
ALK	TPM3	ALK	6	20	NM_001043351	NM_004304	Mediu
ROS1	PPFIBP1	ROS1	8	35	NM_001198915	NM_002944	Mediu
ALK	STRN	ALK	3	20	NM_003162	NM_004304	Mediu
NTRK1	TPM3	NTRK1	7	12	NM_001043351	NM_00100779	Mediu
ROS1	TPM3	ROS1	7	35	NM_001043351	NM_002944	Mediu
NRG1	CD74	NRG1	5	4	NM_001025158	NM_00115999	Scăzută
ALK	CLIP1	ALK	12	20	NM_001247997	NM_004304	Scăzută



Obiectivul principal	gena 5'	gena 3'	exon 5'	exon 3'	5' transcriere	3' transcriere	Probabilitatea de detectabilitate
ALK	EML4	ALK	20	20	NM_001145076	NM_004304	Scăzută
RET	BCR	RET	3	12	NM_004327	NM_020630	Scăzută
NRG1	SDC4	NRG1	4	4	NM_002999	NM_00115999	Scăzută
ROS1	TFG	ROS1	3	35	NM_001007565	NM_002944	Scăzută
FGFR1	CNTRL	FGFR1	38	10	NM_007018	NM_00117406	Scăzută
ALK	KIF5B	ALK	24	20	NM_004521	NM_004304	Scăzută
RET	PRKAR1A	RET	8	12	NM_001276289	NM_020630	Scăzută
RET	KIF5B	RET	1	12	NM_004521	NM_020630	Scăzută
ALK	TPM3	ALK	4	20	NM_001043351	NM_004304	Scăzută
ALK	DCTN1	ALK	23	20	NM_001135040	NM_004304	Scăzută
ALK	STRN	ALK	2	20	NM_003162	NM_004304	Scăzută
NTRK1	TPM4	NTRK1	8	12	NM_001145160	NM_00100779	Scăzută
ROS1	TPM3	ROS1	3	36	NM_001043351	NM_002944	Scăzută
ALK	TPM4	ALK	8	20	NM_001145160	NM_004304	Scăzută
ALK	RANBP2	ALK	18	20	NM_006267	NM_004304	Scăzută

- Detectarea următoarelor fuziuni nu este susținută de produs din cauza problemelor legate de maparea citită a joncțiunilor de fuziune.

gena 5'	gena 3'	exon 5'	exon 3'
TRIM27	RET	3	12
NPM1	ALK	5	20
RANBP2	FGFR1	19	8



- Fuziunile în care punctul de ruptură se află în corpul unui exon pot fi detectate, dar necesită suport molecular suplimentar în comparație cu fuziunile cu puncte de ruptură intronice (>10 molecule de suport).
- Detectarea fuziunilor FGFR4 nu a fost validată în probele clinice de ARN FFPE din cauza rarității unor astfel de evenimente. Fezabilitatea detectării fuziunilor FGFR4 se bazează pe următoarele:
  - a. S-a observat că exonii țintiți ai FGFR4 prezintă o acoperire moleculară relativ ridicată într-o gamă de probe clinice, ceea ce susține capacitatea produsului de a detecta eventuale transcrieri de fuziune FGFR4 care implică acești exoni.
  - b. Detectarea unei fuziuni FGFR4 relevante din punct de vedere clinic a fost verificată în silico (a se vedea mai sus) pentru a confirma că volumul limitat de date care susțin rearanjarea în această țintă este recunoscut corect de pipeline-ul analitic SOPHiA DDM™ Dx ROS.
  - c. Capacitatea de detectare a evenimentelor de fuziune multiple ale genelor omoloage FGFR1, FGFR2 și FGFR3 a fost confirmată atât pe probe clinice, cât și in silico.
- Evenimentele din regiunile pentru care fragmentul relevant de ARN nu este captat de sonde nu pot fi detectate de produs. Capturarea transcrierilor poate fi limitată de:
  - a. INDEL-uri care afectează hibridizarea sondelor. Acest lucru poate duce la absența detectării sau la estimarea incorectă a numărului de molecule.
  - b. Prezența mutației (mutațiilor) suplimentare în regiunea țintă a sondei.
- Moleculele individuale de ARN sunt diferențiate de algoritm pe baza coordonatelor de start-end ale citirilor de secvențiere aliniată; se poate întâmpla ca mai multe molecule distincte să genereze citiri cu coordonate de start-end identice și să fie considerate o singură moleculă. În astfel de cazuri, numărul de molecule detectate va fi subestimat.
- IGH este un partener de fuziune relevant din punct de vedere clinic pentru genele IVD definite de COSMIC și fuziunile care implică această genă sunt raportate cu coordonate genomice. Această genă este extrem de polimorfă și este considerată un „locus multi-genic”, fără o transcriere RefSeq atribuită. Deoarece nu există o transcriere univocă atribuită acestei gene, evenimentele de fuziune care o includ nu pot fi adnotate corespunzător.
- Fuziunile de tip readthrough, care apar atunci când două gene adiacente sunt unite prin splicing, nu sunt raportate dacă distanța dintre regiunile care au fost supuse unui eveniment de splicing este mai mică de 100 kb (a se vedea secțiunea Filtrarea și raportarea fuziunii și a exon-skipping).
- În cazuri rare, calitatea probei poate fi estimată greșit pentru probele cu expresie atipică ridicată sau scăzută a genei de control.
- Prezența unei cantități extrem de mari a unei anumite transcrieri țintite de test poate reduce acoperirea moleculară la celelalte ținte și, în consecință, poate diminua performanța testului. Vă rugăm să consultați Anexa I: graficul de acoperire din raportul de asigurare a calității pentru a evalua acest scenariu.























## 10. REFERINȚE

1. Schram AM, Chang MT, Jonsson P, Drilon A. Fusions in solid tumours: diagnostic strategies, targeted therapy, and acquired resistance. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(12):735-748.
2. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, et al. COSMIC: Catalogul mutațiilor somatice în cancer. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D941-D947.
3. Jang YE, Jang I, Kim S, et al. ChimerDB 4.0: o bază de date actualizată și extinsă a genelor de fuziune. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D817-D824.
4. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatică*. 2013;29(1):15-21.
5. CLSI. *Protecția lucrătorilor de laborator împotriva infecțiilor dobândite la locul de muncă - Ghid aprobat*. ediția a 3-a. Clinical & Laboratory Standards Institute; 2005.
6. Odegaard JI, Vincent JJ, Mortimer S, et al. Validarea unui test complet de genotipare a cancerului pe bază de plasmă utilizând metodologiile ortogonale pe bază de țesuturi și plasmă. *Clin Cancer Res*. 2018;24(15):3539-3549.



## 11. 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
	Conține suficient pentru <n> teste
	Importator
	Consultați <b>Secțiunea 5 - Avertismente și măsuri de precauție.</b>
	Consultați <b>Secțiunea 5 - Avertismente și măsuri de precauție.</b>
	Consultați <b>Secțiunea 5 - Avertismente și măsuri de precauție.</b>
	Consultați <b>Secțiunea 5 - Avertismente și măsuri de precauție.</b>
	Consultați <b>Secțiunea 5 - Avertismente și măsuri de precauție.</b>
	Box 1
	Box 2



## 12. ASISTENȚĂ

În cazul în care întâmpinați dificultăți în utilizarea modului SOPHiA DDM™, consultați secțiunea de depanare din Manualul de utilizare al modului SOPHiA DDM™ Dx sau contactați linia noastră de asistență la numărul de telefon +41 21 694 10 60 sau prin e-mail la [support@sophiagenetics.com](mailto:support@sophiagenetics.com). Vă rugăm să accesați [www.sophiagenetics.com](http://www.sophiagenetics.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™.

Orice incident grav survenit în legătură cu dispozitivul trebuie raportat imediat către SOPHiA GENETICS și autorităților competente din statul membru în care este stabilit utilizatorul și/sau pacientul.

Nu utilizați componente care sunt deteriorate. Contactați [support@sophiagenetics.com](mailto:support@sophiagenetics.com) în cazul în care există probleme cu kiturile.



## 13 DEPANARE

Tabelul 8. Recomandări în cazul unui statut de calitate „WARNING” în raportul SOPHiA DDM™ Dx ROS IVD pentru o probă, din cauza unei acoperiri insuficiente (<50×) a genei de control.

CAUZA PRINCIPALĂ	CUM SĂ IDENTIFICAȚI CAUZA PRINCIPALĂ	RECOMANDĂRI PENTRU ATENUARE
Cantitate insuficientă de ARN de intrare	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Randamentul total al bibliotecii &lt;25 ng/ml</li> <li>• Randamentul bibliotecii capturate de &lt;10 ng/ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Folosind o metodă de cuantificare fluorometrică, validați că se utilizează o cantitate minimă de intrare de 50 ng de ARN total per probă.</li> </ul>
Rată scăzută de conversie a bibliotecii (rata de conversie a ARN de intrare în molecule compatibile pentru secvențiere)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Randamentul total al bibliotecii &lt;25 ng/ml</li> <li>• Randamentul bibliotecii capturate de &lt;10 ng/ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asigurați-vă că ARN-ul de intrare nu conține substanțe care inhibă activitatea enzimatică, respectând recomandările privind compoziția tamponului de stocare definite în Secțiunea 5.2.1.</li> <li>• Asigurați-vă că ARN-ul nu este fragmentat excesiv (de exemplu, din cauza contaminării cu RNases) înainte sau în timpul executării protocolului, respectând pragurile minime de integritate a ARN și bunele practici de manipulare a ARN-ului definite în Secțiunea 5.2.1.</li> <li>• Reduceți la minimum riscul de modificare chimică a ARN-ului de intrare prin utilizarea protocoalelor standard de deparafinizare histologică, astfel cum se recomandă în Secțiunea 5.2.1. Dacă este necesar, reduceți duratele de fixare cu formol.</li> </ul>
Echilibrare deficitară a probelor multiplexate în aceeași rulare de secvențiere, rezultând mai puțin de 3 milioane de citiri per probă	<ul style="list-style-type: none"> <li>• În cadrul raportului de asigurare a calității, comparați numărul de citiri între probele secvențiate în aceeași rulare și verificați dacă distribuția citirilor în cadrul rulării este echilibrată sau dacă există probe atipice care prezintă un număr de citiri semnificativ mai mare sau mai mic decât media.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dacă se observă un dezechilibru semnificativ al numărului de citiri între probe, repetați cuantificarea și gruparea bibliotecilor probelor individuale pentru a vă asigura că acestea au aceeași molaritate înainte de a repeta secvențierea.</li> </ul>
Randamentul scăzut al secvențierii, care a dus la un număr de citiri mai mic de 3 milioane pe probă	<ul style="list-style-type: none"> <li>• În cadrul raportului QA, verificați numărul total de citiri produse de rularea de secvențiere. Comparați acest rezultat cu numărul preconizat de citiri, astfel cum este definit de producător (Illumina®): ~260 milioane de citiri paired-end pentru kiturile Mid-Output; ~800</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verificați dacă metricele relevante ale rulării de secvențiere (de exemplu, densitatea brută a clusterelor, clusterelor care trec filtrul, procentul aliniat și distribuția Q30) se încadrează în intervalele normale, pentru a identifica eventuale probleme tehnice ale secvențiatorului sau ale consumabilelor de secvențiere utilizate</li> </ul>



CAUZA PRINCIPALĂ	CUM SĂ IDENTIFICAȚI CAUZA PRINCIPALĂ	RECOMANDĂRI PENTRU ATENUARE
	milioane de citiri paired-end pentru kiturile High-Output (doar CDS)	<p>și, dacă este necesar, contactați echipa de asistență tehnică a producătorului (Illumina®).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Repetați secvențierea cu o concentrație finală ajustată de încărcare a bibliotecii pentru a evita supra- sau subaglomerarea.</li> </ul>



## 14. ANEXA II - PLĂCI DE PRIMERI CU INDEX DUBLU UNIC

32 de primeri cu index dublu unic V2 compatibili cu Illumina® în format de plăci de 96 de godeuri (7 µl fiecare)

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

Secvențe de index pentru primerii cu index dublu unic compatibili cu Illumina®

Index	Secvențe i5 pentru foaia de eșantioane (sample sheet) MiSeq	Secvențe i5 pentru foaia de eșantioane (sample sheet) NextSeq	i7
sgUDI-49	GCTCACTG	CAGTGAGC	ACCAAGGA
sgUDI-50	CAGGATTG	CAATCCTG	CAGACCTG
sgUDI-51	GTCTAGTT	AACTAGAC	CGAGCAAC
sgUDI-52	TGAATGGC	GCCATTCA	TCTTGACT
sgUDI-53	ACGACAAT	ATTGTCGT	GACAATGG
sgUDI-54	GAACGCCA	TGGCGTTC	GTTCTACG
sgUDI-55	CTGTCCTG	CAGGACAG	AACGCTGC
sgUDI-56	ATAAGGAC	GTCCTTAT	GGACATCA
sgUDI-57	TACATTCC	GGAATGTA	TTGAGCTC
sgUDI-58	GGTTAGCT	AGCTAACC	ACGTTGAG
sgUDI-59	CCTGCTGA	TCAGCAGG	CTTCAGGA
sgUDI-60	CCTCAATC	GATTGAGG	TGCCAACT
sgUDI-61	CGAAGAAT	ATTCTTCG	AGGTCATG
sgUDI-62	TAGTCGAG	CTCGACTA	TACTAGCA
sgUDI-63	ATCCTCAC	GTGAGGAT	GTAAGTGT



Index	Secvențe i5 pentru foaia de eșantioane (sample sheet) MiSeq	Secvențe i5 pentru foaia de eșantioane (sample sheet) NextSeq	i7
sgUDI-64	GCTGCAGT	ACTGCAGC	TGAGTTGA
sgUDI-65	GGCAATCG	CGATTGCC	CCTTAGAC
sgUDI-66	GCATCTTA	TAAGATGC	TATCGCCA
sgUDI-67	GTGCTGAA	TTCAGCAC	GCAGAACA
sgUDI-68	ATTGACGC	GCGTCAAT	AGGAATGC
sgUDI-69	GCCGCATT	AATGCGGC	CGTGAGGT
sgUDI-70	TGTAGTCA	TGACTACA	CAATTCAG
sgUDI-71	TCCTCCGA	TCGGAGGA	GGTCCTTC
sgUDI-72	CAATCGAG	CTCGATTG	TTCCGGCA
sgUDI-73	TAAGCCG	CGGACTTA	ATGCCTGA
sgUDI-74	GGACAGTT	AACTGTCC	TCCAGGAC
sgUDI-75	TTGAGTGA	TCACTCAA	GCTGTCAC
sgUDI-76	CGTAACAT	ATGTTACG	CGACGATT
sgUDI-77	TACGCAGT	ACTGCGTA	TCGCAACG
sgUDI-78	ACCTGACC	GGTCAGGT	GAGTTGTA
sgUDI-79	CCACCTGA	TCAGGTGG	CGCTAAGG
sgUDI-80	TCACCGTG	CACGGTGA	TTGCGTGC





Document Approvals  
Approved Date: 07 Apr 2026

Approval Verdict: Approve	Coleman Spence, (cspence@sophiagenetics.com) Regulatory Approval 07-Apr-2026 20:09:21 GMT+0000
------------------------------	---

QA Approval Verdict: Approve	Denisa Dzulova, (ext-ddzulova@sophiagenetics.com) Quality Assurance Approval 07-Apr-2026 20:15:03 GMT+0000
---------------------------------	---