

TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN)

Foglietto illustrativo (EU)

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO. SOLO PER L'ESPORTAZIONE.

Uso previsto

TruSight™ Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN) è un test diagnostico qualitativo *in vitro* che utilizza il sequenziamento mirato di nuova generazione per consentire la valutazione del deficit di ricombinazione omologa (HRD, Homologous Recombination Deficiency) utilizzando il DNA estratto da campioni di tessuto tumorale fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE, Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded) ottenuti da pazienti con tumore ovarico utilizzando lo strumento Illumina® NextSeq™ 550Dx. Il test può essere utilizzato per rilevare varianti di singolo nucleotide, inserzioni, delezioni e grandi riarrangiamenti nei geni BRCA1 e BRCA2 e riportare un punteggio di instabilità genomica (GIS, Genomic Instability Score).

Il test è previsto per l'uso come diagnostica di accompagnamento per identificare le pazienti affette da cancro che possono trarre beneficio dal trattamento con la terapia mirata elencata nella [Tabella 1](#), in conformità con l'etichettatura del prodotto terapeutico approvato.

Tabella 1 Indicazioni per la diagnostica di accompagnamento

Tipo di tumore	Biomarcatori rilevati	Terapia
Carcinoma ovarico, inclusi carcinoma ovarico epiteliale, carcinoma delle tube di Falloppio e carcinoma peritoneale primario	Deficit di ricombinazione omologa (HRD, Homologous Recombination Deficiency) (definito come mutazioni deleterie o sospette deleterie nei geni BRCA1 e BRCA2 e/o punteggio di instabilità genomica positivo)	LYNPARZA® (olaparib)

Riepilogo e descrizione del saggio

Descrizione clinica

Il carcinoma ovarico ha il tasso di mortalità più alto tra le neoplasie ginecologiche.¹ Il carcinoma ovarico include tumori epiteliali ovarici, delle tube di Falloppio e peritoneali primari, che condividono tutti un'origine biologica comune e sono considerati insieme per scopi terapeutici.^{2,3} Circa la metà delle pazienti con carcinoma ovarico sieroso ed endometrioidale di alto grado, che sono sottocategorie istologiche applicabili da considerare, presentano difetti genomici all'interno del percorso di riparazione della ricombinazione omologa che si traduce in HRD.⁴ La presenza di HRD è associata alla sensibilità alla chemioterapia a base di platino⁵ e alla risposta clinica agli inibitori della poli (adenosina difosfato [ADP]-ribosio) polimerasi (PARPi), una classe di terapie mirate per il carcinoma ovarico,⁶⁻¹² con conseguente miglioramento della sopravvivenza libera da progressione e

complessiva.^{5,13,14} In conformità con i risultati ottenuti da studi clinici seminali, l'idoneità a ricevere il trattamento con PARPi nel carcinoma ovarico può essere basata sullo stato positivo per HRD.¹⁶ PAOLA-1 era uno studio multicentrico, di fase III, randomizzato, in doppio cieco, controllato verso placebo volto a valutare l'efficacia clinica di olaparib più bevacizumab come terapia di mantenimento di prima linea per pazienti con carcinoma ovarico in stadio avanzato.¹² Il saggio TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive) HRD (DRAGEN) è stato convalidato utilizzando campioni di pazienti arruolate nella sperimentazione clinica PAOLA-1.

Tra i vari meccanismi di base che compromettono il percorso di riparazione della ricombinazione omologa, i più caratterizzati sono le mutazioni della linea germinale e/o della perdita di funzione somatica nei geni BRCA1 e BRCA2.^{4,13,17} I test che valutano l'instabilità genomica (ad es. sostituzioni, delezioni, alterazioni del numero di copie e riarrangiamenti strutturali) valutano la presenza di una cicatrice genomica o di una firma mutazionale indicativa della presenza di HRD indipendentemente dalla causa di base. Il GIS è una misurazione dell'instabilità genomica che combina le informazioni sulle transizioni di stato su larga scala (LST), sulla perdita di eterozigosi (LOH) e sullo squilibrio telomerico-allelico (TAI). I dati disponibili delle sperimentazioni cliniche confermano la validità clinica di GIS come biomarcatore che identifica le pazienti affette da carcinoma ovarico BRCA wild type che ottengono benefici significativi dalla terapia PARPi.^{7,9,12,18}

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) è un test qualitativo di sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) per la diagnostica complementare (CDx, Companion Diagnostic) che riporta lo stato HRD nelle pazienti affette da carcinoma ovarico rilevando varianti piccole di DNA e delezioni a livello di esone (indicate come riarrangiamenti di grandi dimensioni [LR, Large Rearrangements]) nei geni BRCA1 e BRCA2, in combinazione con la valutazione GIS relativa a un cut-off di 42.

Per un elenco delle regioni nei geni BRCA1 e BRCA2 escluse dalle identificazioni di varianti, consultare *Blocklist di TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN)* (documento n. 200066147) disponibile sul Illumina [sito di supporto](#).

Principi della procedura

Il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) è un test distribuito eseguito manualmente utilizzando l'acido nucleico estratto come materiale di input. Il DNA estratto da tessuto FFPE viene utilizzato per preparare librerie arricchite per i geni correlati a HRD da sequenziare sullo strumento NextSeq 550Dx.

Il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) include i seguenti processi.

- **Preparazione e arricchimento delle librerie:** dal tessuto FFPE, 40 ng di DNA genomico (gDNA) viene tagliato in piccoli frammenti. Gli adattatori universali per il sequenziamento vengono legati sui frammenti di gDNA. Durante il sequenziamento, le sequenze di adattatori P5 e P7 vengono incorporate in ogni libreria per consentire la cattura dei frammenti di libreria sulla superficie della cella a flusso. Gli adattatori includono gli indici di sequenza i5 e i7 per identificare ciascun singolo campione e ciascuna singola molecola con l'utilizzo di identificatori molecolari univoci (UMI). Le librerie vengono quindi arricchite per i geni specifici di interesse utilizzando un metodo basato sulla cattura. Le sequenze di sonde biotinilate che coprono le regioni geniche di interesse, che rappresentano il target del saggio, vengono ibridate sulla base delle librerie. Le sonde e le librerie ibridate target vengono isolate dalle librerie non target mediante cattura con particelle magnetiche

di streptavidina. Le librerie target arricchite vengono lavate e amplificate. La quantità di ogni libreria arricchita viene poi normalizzata, utilizzando un metodo basato su microsfere, per garantire una rappresentazione uguale nelle librerie raggruppate per il sequenziamento.

- **Sequenziamento e analisi primaria:** le librerie normalizzate e arricchite vengono raggruppate in pool e clusterizzate su una cella a flusso e poi sequenziate utilizzando la chimica di sequenziamento mediante sintesi (SBS) in NextSeq 550Dx. La chimica SBS utilizza un metodo terminatore reversibile per rilevare singole basi deossinucleotidiche trifosfato (dNTP) marcate in modo fluorescente mentre vengono incorporate nei filamenti di DNA in estensione. Durante ciascun ciclo di sequenziamento, un singolo dNTP viene aggiunto alla catena di acido nucleico. La marcatura dNTP serve come terminatore per la polimerizzazione. Dopo ogni incorporazione di dNTP, il colorante fluorescente viene sottoposto a imaging per identificare la base, e poi scisso per permettere l'incorporazione del nucleotide successivo. Quattro dNTP reversibili legati al terminatore (A, G, T e C) sono presenti come molecole singole e distinte. Di conseguenza, la competizione naturale riduce al minimo le distorsioni dovute all'incorporazione. Durante l'analisi primaria, l'identificazione delle basi viene effettuata direttamente dalle misurazioni dell'intensità del segnale durante ogni ciclo di sequenziamento, con conseguente sequenziamento base per base. A ogni identificazione delle basi viene assegnato un punteggio qualitativo.
- **Analisi secondaria:** il Modulo di analisi TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) risiede nello strumento Server DRAGEN nell'ambito del software strumento NextSeq 550Dx; il suo scopo è facilitare la configurazione della sessione TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) ed eseguire l'analisi secondaria dei risultati del sequenziamento. Modulo di analisi TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) esegue l'analisi che include la convalida dell'elaborazione della sessione e il controllo qualità, seguito da demultiplex, generazione di file FASTQ, allineamento e identificazione delle varianti. Il demultiplex separa i dati dalle librerie raggruppate in pool sulla base degli indici di sequenza unici aggiunti durante la procedura di preparazione delle librerie. Il software genera file intermedi FASTQ che contengono le letture di sequenziamento con punteggi qualitativi per ciascun campione ed escludono le letture provenienti da cluster che non hanno attraversato il filtro. Le letture di sequenziamento vengono poi allineate con un genoma di riferimento per identificare una relazione tra le sequenze e assegnare un punteggio basato sulle regioni di somiglianza. Le letture allineate vengono scritte su file in formato BAM. Il software del saggio utilizza algoritmi separati per definire le varianti piccole di DNA BRCA1 e BRCA2, i grandi riarrangiamenti di BRCA1 e BRCA2 e GIS. Il modulo del software di analisi genera diversi output, tra cui metriche di sequenziamento e file VCF (Variant Call Format). I file VCF contengono informazioni sulle varianti trovate in posizioni specifiche in un genoma di riferimento. Per ogni campione vengono generati metriche di sequenziamento e singoli file di output.
- **Analisi terziaria:** l'analisi terziaria, eseguita da Modulo di analisi TSO Comprehensive (EU, DRAGEN), consiste nell'identificazione di CDx e nella generazione di report sui risultati. I risultati delle varianti interpretate sono riepilogati nel report dei risultati TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Consultare la *Guida al flusso di lavoro del modulo di analisi di Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)* (documento n. 200080937) per i dettagli sull'analisi secondaria e terziaria.

Limiti della procedura

Solo per uso diagnostico *in vitro*.

- Solo su prescrizione medica. Il test deve essere prescritto da un medico qualificato in conformità alle normative del laboratorio clinico.
- Le decisioni sulla cura e sul trattamento dei pazienti deve basarsi su un giudizio medico indipendente da parte del medico curante, prendendo in considerazione tutte le informazioni applicabili relative alla condizione del paziente, come anamnesi del paziente e della famiglia, esame obiettivo, informazioni su altri test diagnostici e preferenze del paziente, in base agli standard di cura di una data comunità.
- La qualità dei campioni in FFPE sono di qualità variabile. La qualità può essere influenzata come segue.
 - I campioni che non sono stati sottoposti a procedure di fissazione standard potrebbero non generare acidi nucleici estratti che soddisfino i requisiti di controllo qualità del saggio ([Controllo qualità alla pagina 71](#)).
 - Le mutazioni somatiche driver potrebbero non essere rilevate in modo affidabile se il contenuto tumorale (per area) fosse inferiore al 20%.
 - Il GIS potrebbe non essere affidabile se il contenuto tumorale (per area) è inferiore al 33%.
- Le prestazioni di TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) in campioni ottenuti da pazienti che sono stati sottoposti a trapianti di organo o tessuto non sono state valutate.
- Il rilevamento della contaminazione può essere influenzato come segue.
 - In genomi altamente riarrangiati con delezioni e perdita di eterozigosità, il software TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) può erroneamente classificare un campione di DNA come contaminato (CONTAMINATION_SCORE > 1457).
 - La contaminazione durante la procedura può derivare dall'acido nucleico proveniente da precedenti fasi di elaborazione dei campioni. Le buone pratiche di laboratorio e il rispetto di tutte le precauzioni e linee guida contenute in questo foglietto illustrativo consentono di evitare la contaminazione incrociata tra i campioni.
- Un risultato negativo non esclude la presenza di una mutazione al di sotto del limite di rilevamento (LoD, Limits of Detection) del saggio. Le alterazioni con frequenze alleliche inferiori al LoD stabilito potrebbero non essere rilevate in modo sistematico.
- Quanto segue può influire sulla sensibilità del rilevamento di varianti piccole di DNA:
 - Contenuto genomico di bassa complessità
 - Incremento della lunghezza della variante
- TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) è stato convalidato per il rilevamento di inserzioni e delezioni di BRCA fino a 19 bp di lunghezza e grandi riarrangiamenti di BRCA a livello di esone o superiore. Le varianti di lunghezza superiore a 19 bp e le alterazioni e gli eventi sub-esonici potrebbero non essere rilevati dal test, ma potrebbero avere un impatto sullo stato di HRD. Si consigliano adeguate correlazioni clinicopatologiche e di laboratorio.
- Le delezioni a livello di esone sono gli unici grandi riarrangiamenti riportati da TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Le inserzioni a livello di esone non sono riportate dal saggio.

Componenti del prodotto

Il TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) test è costituito dai componenti seguenti:

- Kit TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN) (Illumina n. di catalogo 20140799) – Il kit include reagenti con volume sufficiente per generare 24 librerie di DNA. Questo volume include i campioni e i controlli dei pazienti. Il kit contiene il set di sonde utilizzato per rilevare le mutazioni BRCA. Controlli venduti separatamente (consultare [Reagenti richiesti, non forniti alla pagina 15](#)).



ATTENZIONE

I reagenti per la preparazione delle librerie di RNA sono forniti con il kit TSO Comprehensive (DRAGEN) ma non sono richiesti per il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

- Kit TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN) (Illumina n. di catalogo 20134650) – Il kit include reagenti con volume sufficiente per generare 24 arricchimenti di librerie di DNA. Questo volume include i campioni e i controlli dei pazienti. Il kit contiene il set di sonde utilizzato per la determinazione GIS.
- Modulo di analisi Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) (Illumina n. di catalogo 20132935), che include i seguenti componenti:
 - Pacchetti istanze TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)
 - Suite del software TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)
 - Kit USB TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)

Un rappresentante dell'assistenza Illumina installa la versione appropriata dello Modulo di analisi TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) e il pacchetto attestazioni sul Server DRAGEN per lo strumento NextSeq 550Dx. Per informazioni sul modulo di analisi, consultare *Guida al flusso di lavoro del modulo di analisi di Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)* (documento n. 200080937).

Reagenti

Reagenti forniti

Illumina fornisce i seguenti reagenti.

Kit TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN) (Illumina n. di catalogo 20140799)

TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze), n. codice 20031118

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente DNA polimerasi e polinucleotide chinasi T4	Tra -25 °C e -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e nucleotidi	Tra -25 °C e -15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	Tra -25 °C e -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente ligasi	Tra -25 °C e -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)*	20031439	1	290 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente oligonucleotidi di sequenziamento universali	Tra -25 °C e -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente oligonucleotidi di sequenziamento universali	Tra -25 °C e -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	Tra -25 °C e -15 °C
Enhanced PCR Mix (Miscela per PCR rafforzata) (EPM)	20031441	2	550 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente DNA polimerasi e nucleotidi	Tra -25 °C e -15 °C

* Reagente fornito ma non richiesto per TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate), n. codice 20031119

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	Tra 2 °C e 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Soluzione acquosa contenente microsfere magnetiche	Tra 2 °C e 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Soluzione Tris EDTA	Tra 2 °C e 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, n. codice 20031120

Ingredienti attivi: soluzione acquosa tamponata contenente primer oligonucleotidici con codice a barre singolo.

**ATTENZIONE**

Non combinare tra loro gli index primer CPxx e UPxx nella stessa libreria.

Index primer	N. codice Numero	Quantità	Volume	Indice i7	Sequenziamento i7	Indice i5	Sequenziamento i5	Temperatura di conservazione
UP01	20031445	1	24 µl	D702	TCCGGAGA	D503	AGGATAGG	Tra -25 °C e -15 °C
UP02	20031446	1	24 µl	D707	CTGAAGCT	D504	TCAGAGCC	Tra -25 °C e -15 °C
UP03	20031447	1	24 µl	D717	CGTAGCTC	D509	CATCCGAA	Tra -25 °C e -15 °C
UP04	20031448	1	24 µl	D706	GAATTCGT	D510	TTATGAGT	Tra -25 °C e -15 °C
UP05	20031449	1	24 µl	D712	AGCGATAG	D513	ACGAATAA	Tra -25 °C e -15 °C
UP06	20031450	1	24 µl	D724	GCGATTAA	D515	GATCTGCT	Tra -25 °C e -15 °C
UP07	20031451	1	24 µl	D705	ATTCAGAA	D501	AGGCTATA	Tra -25 °C e -15 °C
UP08	20031452	1	24 µl	D713	GAATAATC	D502	GCCTCTAT	Tra -25 °C e -15 °C
UP09	20031453	1	24 µl	D715	TTAATCAG	D505	CTTCGCCT	Tra -25 °C e -15 °C
UP10	20031454	1	24 µl	D703	CGCTCATT	D506	TAAGATTA	Tra -25 °C e -15 °C
UP11	20031455	1	24 µl	D710	TCCGCGAA	D517	AGTAAGTA	Tra -25 °C e -15 °C
UP12	20031456	1	24 µl	D701	ATTACTCG	D518	GACTTCCT	Tra -25 °C e -15 °C
UP13	20031457	1	24 µl	D716	ACTGCTTA	D511	AGAGGCGC	Tra -25 °C e -15 °C
UP14	20031458	1	24 µl	D714	ATGCGGCT	D512	TAGCCGCG	Tra -25 °C e -15 °C
UP15	20031459	1	24 µl	D718	GCCTCTCT	D514	TTCGTAGG	Tra -25 °C e -15 °C
UP16	20031460	1	24 µl	D719	GCCGTAGG	D516	CGCTCCGC	Tra -25 °C e -15 °C

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, n. codice 20031126

Ingredienti attivi: soluzione acquosa tamponata contenente primer oligonucleotidici con codice a barre singolo.

**ATTENZIONE**

Non combinare tra loro gli index primer CPxx e UPxx nella stessa libreria.

Index primer	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Indice i7	Sequenziamento	Indice i5	Sequenziamento	Temperatura di conservazione
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	Tra -25 °C e -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	Tra -25 °C e -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	Tra -25 °C e -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	Tra -25 °C e -15 °C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	Tra -25 °C e -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	Tra -25 °C e -15 °C

Index primer	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Indice i7	Sequenziamento	Indice i5	Sequenziamento	Temperatura di conservazione
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	Tra -25 °C e -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	Tra -25 °C e -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	Tra -25 °C e -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	Tra -25 °C e -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	Tra -25 °C e -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	Tra -25 °C e -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	Tra -25 °C e -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	Tra -25 °C e -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	Tra -25 °C e -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	Tra -25 °C e -15 °C

TruSight Oncology Comp Arricchimento (refrigerazione), n. codice 20031123

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente formammide e sali	Tra 2 °C e 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e microsfere paramagnetiche in fase solida rivestiti covalentemente con streptavidina	Tra 2 °C e 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Soluzione di idrossido di sodio	Tra 2 °C e 8 °C
Tampone eluizione target 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Soluzione acquosa tamponata	Tra 2 °C e 8 °C
Library Normalization Beads (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente microsfere paramagnetiche in fase solida	Tra 2 °C e 8 °C

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	La soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanol e formammide	Tra 2 °C e 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	Tra 2 °C e 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	Da 2 °C a 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Soluzione acquosa contenente microsfere magnetiche	Tra 2 °C e 8 °C

TruSight Oncology Comp Arricchimento (congelamento), n. codice 20031121

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente oligonucleotidi	Tra -25 °C e -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	Tra -25 °C e -15 °C
Enrichment Solution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente detergente	Tra -25 °C e -15 °C

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Enhanced PCR Mix (Miscela per PCR rafforzata) (EPM)	20031441	2	550 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente DNA polymerase e nucleotidi	Tra -25 °C e -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente primer P5 e P7	Tra -25 °C e -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	La soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	Tra -25 °C e -15 °C
PhiX (PX3 o PhiX)	20031492	1	10 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente DNA genomico PhiX	Tra -25 °C e -15 °C

Content Set TruSight Oncology Comp (n. codice 20031122)

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)*	20031494	1	290 µl	Raggruppamento sonda oligonucleotidi	Tra -25 °C e -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Raggruppamento sonda oligonucleotidi	Tra -25 °C e -15 °C

* Reagente fornito ma non richiesto per TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

TruSight Oncology Comp Preparazione delle librerie di RNA, n. codice 20031127

I seguenti reagenti sono forniti ma non sono richiesti per TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e nucleotidi	Tra -25 °C e -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, DNA polimerasi, RNasi H e nucleotidi	Tra -25 °C e -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente sali ed esameri random	Tra -25 °C e -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente reverse transcriptase	Tra -25 °C e -15 °C

Kit TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN) (Illumina n. di catalogo 20134650):

TruSight Oncology Comp Arricchimento HRD (refrigerazione), n. codice 20140116

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	1	870 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente formammide e sali	Tra 2 °C e 8 °C

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	1	7,78 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e microsfere paramagnetiche in fase solida rivestiti covalentemente con streptavidina	Tra 2 °C e 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	1	400 µl	Soluzione di idrossido di sodio	Tra 2 °C e 8 °C
Tampone eluizione target 2 (ET2)	20031480	1	290 µl	Soluzione acquosa tamponata	Tra 2 °C e 8 °C
Library Normalization Beads (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente microsfere paramagnetiche in fase solida	Tra 2 °C e 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNB1)	20031482	1	4,8 ml	La soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	Tra 2 °C e 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	1	3,5 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	Tra 2 °C e 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	Da 2 °C a 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	1	6,11 ml	Soluzione acquosa contenente microsfere magnetiche	Tra 2 °C e 8 °C

TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze), n. codice 20140115

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	1	521 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente oligonucleotidi	Tra -25 °C e -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	Tra -25 °C e -15 °C
Enrichment Solution 2 (EE2)	20031488	2	1,65 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente detergente	Tra -25 °C e -15 °C
Enhanced PCR Mix (Miscela per PCR rafforzata) (EPM)	20031441	1	550 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente DNA polymerase e nucleotidi	Tra -25 °C e -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	1	150 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente primer P5 e P7	Tra -25 °C e -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	La soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-Mercaptoetanolo e formammide	Tra -25 °C e -15 °C

TruSight Oncology Comp HRD Content Set, n. codice 20140117

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Oncology DNA Probe Pool 3 (OPD3)	20082795	1	290 µl	Raggruppamento sonda oligonucleotidi	Tra -25 °C e -15 °C

Reagenti richiesti, non forniti

Reagenti pre-amplificazione

- Reagenti di estrazione e purificazione del DNA – Consultare [Estrazione, quantificazione e conservazione dell'acido nucleico alla pagina 24](#) per i requisiti dei reagenti.
- Reagenti di quantificazione del DNA – Consultare [Estrazione, quantificazione e conservazione dell'acido nucleico alla pagina 24](#) per i requisiti dei reagenti.
- Controlli TruSight Oncology:
 - TruSight Oncology DNA Control v2 (Illumina n. catalogo 20090155)
- Etanolo (EtOH) 100% (200 proof), grado biologia molecolare
- Acqua priva di DNasi/RNasi

Reagenti post-amplificazione

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cicli) (Illumina n. di catalogo 20028871)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cicli)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicli)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cicli)
- Etanolo, 100% (200 proof), biologia molecolare
- Acqua priva di DNasi/RNasi

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Le seguenti confezioni di reagenti vengono spedite congelate. Conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C.

Confezione	Codice dell'articolo	Area di laboratorio
TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze)	20031118	Pre-amplificazione
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Pre-amplificazione
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Pre-amplificazione
TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze)	20031121	Post-amplificazione
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Post-amplificazione
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Pre-amplificazione
TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze)	20140115	Post-amplificazione
TruSight Oncology Comp HRD Content Set	20140117	Post-amplificazione

Le seguenti confezioni di reagenti vengono spedite in imballaggi di gel refrigerante in grado di mantenere una temperatura da 0 °C a 10 °C. Conservare a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

Confezione	Codice dell'articolo	Area di laboratorio
TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate)	20031119	Pre-amplificazione
TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate)	20031123	Post-amplificazione
TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate)	20140116	Post-amplificazione

**ATTENZIONE**

Non conservare i reagenti in un'unità di stoccaggio antibrina o negli scomparti dello sportello del frigorifero.

**ATTENZIONE**

Non congelare i reagenti contenenti microsfere (LNB1, SPB e SMB).

- Cambiamenti nell'aspetto fisico dei reagenti possono indicare un deterioramento dei materiali. Se si verificassero cambiamenti nell'aspetto fisico (ad esempio, cambiamenti nel colore del reagente o intorbidimento), non usare i reagenti.
- ERA1-B e TCB1 possono contenere particolato correlato al prodotto. Seguire le linee guida specifiche per la manipolazione di ciascun reagente.
- La stabilità del saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) è stata valutata e le prestazioni sono state dimostrate per un massimo di quattro utilizzi del kit. I reagenti sono stabili se conservati alle temperature indicate fino alla data di scadenza specificata sull'etichetta della confezione.

Apparecchiature e materiali

Apparecchiature e materiali richiesti, non forniti

Apparecchiature e materiali per pre-amplificazione

Apparecchiatura	Fornitore
Sonificatore a ultrasuoni e relativi accessori Consultare Impostazioni di configurazione del sonificatore a ultrasuoni per la frammentazione del DNA alla pagina 20 .	Fornitore di laboratorio generico
Vortex	Fornitore di laboratorio generico

Apparecchiatura	Fornitore
Incubatori per microcampioni (2) con inserti per piastre MIDI a 96 pozzetti (2)	Fornitore di laboratorio generico
Microcentrifuga	Fornitore di laboratorio generico
Centrifuga per piastre con le specifiche seguenti: • Compatibile con micropiastre MIDI a 96 pozzetti • Capacità: 280 × g (+/- 10%)	Fornitore di laboratorio generico
Shaker per piastre con le specifiche seguenti: • Raggio orbitale di 2 mm • Capacità di agitare a 1.200 e 1.800 giri/min	Fornitore di laboratorio generico
Cuneo o rullo sigillante	Fornitore di laboratorio generico
Supporto magnetico con le seguenti specifiche: • Progettato per la precipitazione/separazione di microsfele paramagnetiche • Magneti sul lato del supporto (non sul fondo) • Compatibile con le piastre MIDI a 96 pozzetti	Fornitore di laboratorio generico
Pipette di precisione in grado di erogare con precisione volumi compresi tra 2 µl e 1000 µl con le seguenti specifiche: • Pipetta monocanale o multicanale con incremento di 0,02 µl • Pipetta monocanale o multicanale con incremento di 0,1 µl, 0,2 µl o 0,5 µl • Pipetta monocanale o multicanale con incremento di 1 µl o 2 µl Le pipette devono essere calibrate regolarmente e con una precisione del 5% rispetto al volume dichiarato.	Fornitore di laboratorio generico
Dosatore pipette	Fornitore di laboratorio generico
Blocco ghiaccio o freddo	Fornitore di laboratorio generico
Pipette sierologiche da 10 ml	Fornitore di laboratorio generico

Apparecchiatura	Fornitore
Sigillo adesivo per piastre a 96 pozzetti con le seguenti specifiche: • Rimovibile • Adatto per piastre PCR skirted o semiskirted • Adesivo forte in grado di resistere a più sbalzi di temperatura da -20 °C a 100 °C • Privo di DNasi/RNasi	Fornitore di laboratorio generico
Provette per microcentrifuga da 1,7 ml, prive di nucleasi	Fornitore di laboratorio generico
Serbatoi di reagente privi di nucleasi (monouso, 50 ml) (o equivalente)	Fornitore di laboratorio generico
Provette coniche da 15 ml	Fornitore di laboratorio generico
Provette coniche da 50 ml	Fornitore di laboratorio generico
Punte per pipette dotate di barriera aerosol compatibili	Fornitore di laboratorio generico
Piastre di conservazione a 96 pozzetti, 0,8 ml (piastre MIDI)	Fisher Scientific, n. codice AB-0859 o equivalente
Piastre PCR a 96 pozzetti compatibili con termociclatore, 0,2 ml (pozzetti in polipropilene)	Fornitore di laboratorio generico

Apparecchiature e materiali per post-amplificazione

Apparecchiatura	Fornitore
Strumento NextSeq 550Dx	Illumina, N. di catalogo 20005715
Centrifuga per piastre con le specifiche seguenti: • Compatibile con micropiastre MIDI a 96 pozzetti • Capacità: 280 × g (+/- 10%)	Fornitore di laboratorio generico
Ciclatore termico dotato delle seguenti specifiche: • Coperchio riscaldato (100 °C) • Comprende un intervallo di temperatura da 4 °C a 99 °C • Accuratezza temperatura ±0,25 °C • Compatibile con piastre PCR a 96 pozzetti da 0,2 ml • Consultare Velocità di rampa del ciclatore termico alla pagina 23.	Fornitore di laboratorio generico

Apparecchiatura	Fornitore
Vortex	Fornitore di laboratorio generico
Incubatore per microcampioni con inserto per piastre MIDI a 96 pozzetti	Fornitore di laboratorio generico
Blocco termico secco con le seguenti specifiche: • Intervallo di temperatura da 25 °C a 99 °C • Accuratezza temperatura ± 5 °C • Assicurarsi che le provette per microcentrifuga siano compatibili con il blocco di calore	Fornitore di laboratorio generico
Shaker per piastre con le specifiche seguenti: • Raggio orbitale di 2 mm • Capacità di agitare a 1.200 e 1.800 giri/min	Fornitore di laboratorio generico
Microcentrifuga	Fornitore di laboratorio generico
Cuneo o rullo sigillante	Fornitore di laboratorio generico
Supporto magnetico con le seguenti specifiche: • Progettato per la precipitazione/separazione di microsfele paramagnetiche • Magneti sul lato del supporto (non sul fondo) • Compatibile con le piastre MIDI a 96 pozzetti	Fornitore di laboratorio generico
Pipette di precisione in grado di erogare con precisione volumi compresi tra 2 μ l e 1000 μ l con le seguenti specifiche: • Pipetta monocanale o multicanale con incremento di 0,02 μl • Pipetta monocanale o multicanale con incremento di 0,1 μl, 0,2 μl o 0,5 μl • Pipetta monocanale o multicanale con incremento di 1 μl o 2 μl Le pipette devono essere calibrate regolarmente e con una precisione del 5% rispetto al volume dichiarato.	Fornitore di laboratorio generico
Dosatore pipette	Fornitore di laboratorio generico
Pipette sierologiche da 10 ml	Fornitore di laboratorio generico

Apparecchiatura	Fornitore
Sigillo adesivo per piastre a 96 pozzetti con le seguenti specifiche: • Rimovibile • Adatto per piastre PCR skirted o semiskirted • Adesivo forte in grado di resistere a più sbalzi di temperatura da -20 °C a 100 °C • Privo di DNasi/RNasi	Fornitore di laboratorio generico
Provette per microcentrifuga da 2 ml, prive di nucleasi	Fornitore di laboratorio generico
Provette per microcentrifuga da 1,7 ml, prive di nucleasi	Fornitore di laboratorio generico
Serbatoi di reagente privi di nucleasi (monouso, 50 ml) (o equivalente)	Fornitore di laboratorio generico
Provette coniche da 15 ml	Fornitore di laboratorio generico
Provette coniche da 50 ml	Fornitore di laboratorio generico
Punte per pipette dotate di barriera aerosol compatibili	Fornitore di laboratorio generico
Piastre di conservazione a 96 pozzetti, 0,8 ml (piastre MIDI)	Fisher Scientific, n. codice AB-0859 o equivalente
Piastre PCR a 96 pozzetti compatibili con termociclatore, 0,2 ml (pozzetti in polipropilene)	Fornitore di laboratorio generico
Blocco ghiaccio o freddo	Fornitore di laboratorio generico

Impostazioni di configurazione del sonificatore a ultrasuoni per la frammentazione del DNA

La frammentazione o shearing del DNA influisce sulle prestazioni del saggio determinando la distribuzione della dimensione del frammento che, a sua volta, influisce sulla copertura di sequenziamento. Sono state valutate diverse configurazioni mirate di sonificatori a ultrasuoni e ottimizzate per il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) ([Tabella 2](#)).

- La durata dello shearing è stata regolata per massimizzare la metrica MEDIAN_EXON_COVERAGE indicata nella sezione [Controllo qualità alla pagina 71](#). Le durate dello shearing (indicate in grassetto nella [Tabella 2](#)) e i risultati di MEDIAN_INSERT_SIZE differiscono tra le varie configurazioni.

- Le configurazioni 1–4 e 6 sono state testate con provette di vetro a 8 strisce. La configurazione 5 ha utilizzato una singola provetta di vetro. Le capacità di volume delle provette sono mostrate nella [Tabella 2](#).
- L'ottimizzazione delle configurazioni 3–6 (volumi di bagno d'acqua più piccoli) ha utilizzato impulsi.
- Le configurazioni 3–5 sono state divise in provette di volume inferiore. Le capacità di volume delle provette influiscono sui parametri di shearing.
- La configurazione 4 (trasduttore di linea, volume del bagno d'acqua medio, acqua degassata) ha richiesto un lungo tempo di ritardo dell'impulso (40 secondi) per ottenere un MEDIAN_EXON_COVERAGE simile a quello delle configurazioni 1 e 2 con un ingresso nominale di 40 ng.
- Le impostazioni ottimali per la configurazione 3 hanno determinato una distribuzione delle dimensioni dei frammenti leggermente più ampia rispetto alle altre configurazioni (MEDIAN_INSERT_SIZE era di circa 5–10 coppie di basi più grande).
- Le configurazioni 3 e 5 hanno utilizzato acqua non degassata e il più piccolo volume di bagno d'acqua.
- Le configurazioni 3 e 5 hanno richiesto un aumento dell'input di DNA (50 ng per la configurazione 3, 60 ng per la configurazione 5) per ottenere un MEDIAN_EXON_COVERAGE simile rispetto alle altre 4 configurazioni, che hanno utilizzato l'input nominale di 40 ng.
- Le configurazioni 3 e 5 sono più danneggiate e/o denaturate e pertanto avevano una ridotta quantità effettiva di molecole dsDNA utilizzabili per la preparazione delle librerie.

Centrifugare le provette contenenti il materiale di shearing per assicurarsi che il volume specificato venga recuperato in quanto qualsiasi perdita di materiale può influire negativamente sulle prestazioni.

Tabella 2 Configurazioni mirate e valutate di sonificatori a ultrasuoni

Parametro	Configurazione					
	1	2	3	4	5	6
Trasduttore	Linea	Punto	Punto	Linea	Punto	Linea
Volume bagno d'acqua	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Acqua degassata	Sì	Sì	No	Sì	No	Sì
Raffreddatore d'acqua	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Temperatura bagno d'acqua	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Potenza momento di picco (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% fattore di utilizzazione	30	10	30	25	20	25
Cicli per impulsi	200	200	1.000	1.000	1.000	600 ⁵
Impulsi (pulsazioni di 10 secondi)	No	No	Sì	Sì	Sì	Sì
Tempo di ritardo degli impulsi	N/D	N/D	10 s	40 s	10 s	10 s
Durata shearing	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Elaborazione campione	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Dimensione batch	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Dimensione campione per provetta in vetro a otto strisce	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Provetta singola (50 µl)	130 µl (o piastra per 96 microPROVETTE)
Distribuzione del rumore	NA	NA	N/D	3 mm Y a 20 mm/s	N/D	1,5 mm Y a 10 mm/s
Equivalente input di DNA (per copertura mediana degli esoni)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ La durata dello shearing di 200 secondi consiste in impulsi da 10 secondi con 20 ripetizioni.² La durata dello shearing di 320 secondi consiste in impulsi da 10 secondi con 32 ripetizioni.

Velocità di rampa del ciclatore termico

Si raccomanda l'ottimizzazione della velocità di rampa del ciclatore termico. Ad esempio, un modello testato è stato regolato da una velocità di rampa predefinita (e massima) di 5°C/s a 3°C/s per ottenere risultati paragonabili ad altri modelli con velocità di rampa predefinite inferiori.

Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni

Seguire le procedure standard per la raccolta, il trasporto, la conservazione e l'elaborazione dei campioni.

Requisiti dei campioni

Tessuto in FFPE

Il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) richiede 40 ng di DNA estratto da tessuto FFPE ovarico, tube di Falloppio o peritoneale primario. Il tessuto deve essere fissato utilizzando un fissativo a base di formalina adatto per le analisi molecolari (ad esempio, formalina neutra al 10%). Il tessuto non deve essere decalcificato. Prima di eseguire il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN), il campione di tessuto deve essere esaminato da un patologo per assicurarsi che sia adatto per questo test. È richiesto un contenuto minimo di tumore del 20% (per area) per rilevare le mutazioni somatiche "driver". È richiesto un contenuto minimo di tumore del 33% (per area) per rilevare GIS.

Per un'elevata probabilità di estrarre 40 ng di DNA, il volume di tessuto raccomandato è $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Questo volume equivale a un'area tissutale vitale cumulativa $\geq 200 \text{ mm}^2$ utilizzando sezioni spesse $5 \mu\text{m}$ o $\geq 100 \text{ mm}^2$ utilizzando sezioni spesse $10 \mu\text{m}$. L'area cumulativa del tessuto è la somma dell'area del tessuto utilizzabile in tutte le sezioni sottoposte all'estrazione. Ad esempio, un'area di tessuto cumulativa di 200 mm^2 può essere ottenuta estraendo quattro sezioni da $5 \mu\text{m}$ con 50 mm^2 di area di tessuto ciascuna o cinque sezioni da $10 \mu\text{m}$ con 20 mm^2 di area di tessuto ciascuna. La necrosi del tessuto può diminuire l'acido nucleico prodotto. Per ridurre al minimo la possibilità di risultati falsi negativi, il tessuto può essere sottoposto a macrodissezione per eliminare il tessuto necrotico e ottenere un contenuto di tumore utilizzabile.

Il tessuto FFPE montato su vetrino può essere conservato per un massimo di 28 giorni a temperatura ambiente.

Estrazione, quantificazione e conservazione dell'acido nucleico

- Estrarre DNA da campioni di tessuto FFPE utilizzando i kit di estrazione disponibili in commercio. Le differenze nei kit di estrazione possono influire sulle prestazioni. Consultare [Valutazione di Nucleic Acid Extraction Kit alla pagina 93](#).
- Conservare l'acido nucleico estratto seguendo le istruzioni del produttore del kit di estrazione.
- Conservare il DNA estratto per un massimo di 28 giorni a una temperatura compresa tra -25°C e -15°C .
- Per evitare modifiche nella concentrazione nel tempo, misurare il DNA entro 28 giorni dall'inizio della preparazione delle librerie. Quantificare il DNA utilizzando un metodo di quantificazione fluorometrico che utilizza coloranti per legame dell'acido nucleico. La concentrazione di acido nucleico deve risultare da una media di almeno tre misurazioni.

- Il saggio richiede 40 ng di ciascun campione di gDNA con una concentrazione di estrazione minima di 3,33 ng/μl. La frammentazione (shearing) richiede un volume finale di 52 μl (0,77 ng/μl) con un minimo di 40 μl di TEB (fornito) utilizzato come diluente.

Conservazione delle librerie

Conservare le librerie nelle piastre PCR a basso legame per un periodo compreso tra 7 e 32 giorni, a seconda del tipo di libreria (consultare la [Tabella 3](#)).

Tabella 3 Tempistiche di conservazione delle librerie

Tipo di libreria	Piastra	Numero di giorni	Temperatura di conservazione
gDNA frammentato	LP PCR	≤ 7	Tra -25 °C e -15 °C
Pre-aricchimento	ALS PCR	≤ 30	Tra -25 °C e -15 °C
Post-aricchimento	ELU2 PCR	≤ 7	Tra -25 °C e -15 °C
PCR post-aricchimento	PL PCR	≤ 30	Tra -25 °C e -15 °C
Normalizzata	NL PCR	≤ 32	Tra -25 °C e -15 °C

Avvertenze e precauzioni

Sicurezza



AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene materiali chimici potenzialmente pericolosi. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. La manipolazione di materiali pericolosi nei reagenti deve avvenire in presenza di una ventilazione appropriata. Per evitare i rischi di esposizione, indossare l'attrezzatura protettiva idonea, tra cui protezione per gli occhi, guanti e camice da laboratorio. Manipolare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni pertinenti a livello regionale, nazionale e locale. Per ulteriori informazioni su ambiente, salute e sicurezza, consultare le schede dati di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS) alla pagina web support.illumina.com/sds.html.

- Alcuni componenti di questo saggio contengono formammide, una amide alifatica che è cancerogena, nonché una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumento da laboratorio. Maneggiare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base agli standard di sicurezza in vigore nel proprio Paese. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, consultare le SDS cercando il codice prodotto alla pagina Web support.illumina.com/sds.html. (Per ulteriori informazioni, consultare [Reagenti forniti alla pagina 5](#)).

- Alcuni componenti di questo saggio contengono 2-mercaptoetanololo, un agente riducente. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Utilizzarlo in un'area ben ventilata e smaltire i contenitori e i contenuti non utilizzati in conformità agli standard applicabili di sicurezza in vigore localmente. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, consultare le SDS cercando il codice prodotto alla pagina Web support.illumina.com/sds.html. (Per ulteriori informazioni, consultare [Reagenti forniti alla pagina 5](#)).
- Alcuni componenti di questo saggio contengono idrossido di sodio, una base altamente corrosiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumento da laboratorio. Maneggiare in conformità con le buone pratiche di laboratorio e smaltire in conformità alle leggi e alle normative locali, nazionali e regionali vigenti. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, consultare le SDS cercando il codice prodotto alla pagina Web support.illumina.com/sds.html. (Per ulteriori informazioni, consultare [Reagenti forniti alla pagina 5](#)).
- Alcuni componenti di questo saggio (EPM) contengono cloruro di tetrametilammonio, una sostanza tossica acuta, irritante per la pelle e inquinante marino. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumento da laboratorio. Maneggiare in conformità con le buone pratiche di laboratorio e smaltire in conformità alle leggi e alle normative locali, nazionali e regionali vigenti. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, consultare le SDS cercando il codice prodotto alla pagina Web support.illumina.com/sds.html. (Per ulteriori informazioni, consultare [Reagenti forniti alla pagina 5](#)).
- Maneggiare tutti i campioni come se fossero infetti.
- Adottare le normali precauzioni di laboratorio. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere o fumare nelle aree designate per il lavoro. Manipolare i campioni e i reagenti del saggio indossando guanti e indumenti da laboratorio monouso. Dopo aver maneggiato i campioni e i reagenti del saggio lavarsi bene le mani.
- Riferire immediatamente ogni incidente grave relativo a questo prodotto a Illumina e alle autorità competenti degli stati membri nei quali l'utente e il paziente risiedono.

Laboratorio

- Per evitare la contaminazione, all'interno del laboratorio organizzare un flusso di lavoro unidirezionale. Le aree di pre-amplificazione e post-amplificazione devono essere dotate di apparecchiature e materiali dedicati (ad esempio pipette, punte per pipette, vortex e centrifuga). Per prevenire il carryover del prodotto di amplificazione o della sonda, non tornare nell'area di pre-amplificazione dopo essere entrati nell'area di post-amplificazione.
- Eseguire le fasi di indicizzazione PCR e di arricchimento in un'area post-amplificazione per evitare il carry-over del prodotto dell'amplificazione.

- Le procedure di preparazione delle librerie richiedono un ambiente-privo di RNasi/DNasi. Decontaminare accuratamente le aree di lavoro con un detergente inibitore di RNasi/DNasi-. Utilizzare plastica certificata priva di DNasi, RNasi e DNA genomico umano.
- Per le procedure di post-amplificazione, prima e dopo ogni procedura, pulire accuratamente le superfici di lavoro e le apparecchiature utilizzando una soluzione di ipoclorito di sodio (NaOCl) allo 0,5% preparata al momento. Lasciare la soluzione a contatto con le superfici per 10 minuti, quindi pulire accuratamente con alcol etilico o isopropilico al 70%.
- Utilizzare provette da microcentrifuga, piastre, punte di pipette e serbatoi privi di nucleasi.
- Utilizzare apparecchiature calibrate per tutte le fasi del saggio. Assicurarsi di calibrare le apparecchiature alle velocità, temperature e volumi specificati in questo protocollo.
- Utilizzare pipette di precisione per garantire un'accurata erogazione di reagenti e campioni. Calibrare regolarmente secondo le specifiche del produttore.
- Quando si utilizzano pipette multicanale, attenersi alle seguenti linee guida:
 - Pipettare un minimo di $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Assicurarsi che le punte a barriera siano ben aderenti e appropriate alla marca e al modello della pipetta multicanale.
 - Fissare le punte con un movimento rotatorio per garantire che tutte le punte siano ben fissate.
 - Aspirare con un angolo di 90° , con uguali livelli di volume di liquido in tutte le punte.
 - Miscelare tutti i componenti dopo l'erogazione pipettando la miscela di reazione verso l'alto e verso il basso.
 - Dopo l'erogazione, verificare che il liquido sia stato completamente erogato da ogni punta.
- Assicurarsi di utilizzare le apparecchiature specificate per il test e di impostare i programmi come indicato.
- Le temperature dichiarate per il ciclatore termico e l'incubatore di microcampioni indicano la temperatura di reazione, non necessariamente la temperatura impostata sull'apparecchiatura.

Saggio

- Evitare la contaminazione incrociata.
 - Quando si maneggiano campioni e reagenti, seguire le corrette pratiche di laboratorio.
 - Tra un campione e l'altro e tra un'erogazione e l'altra dei reagenti, usare utensili da laboratorio e punte di pipette nuovi.
 - Per ridurre il rischio di contaminazione incrociata, utilizzare punte dotate di barriera aerosol.
 - Quando ci si sposta dalle aree di pre-amplificazione a quelle di post-amplificazione, utilizzare un flusso di lavoro unidirezionale.
 - Maneggiare e aprire solo un index primer alla volta. Richiudere ogni provetta di indice immediatamente dopo l'uso. Il kit contiene dei tappi extra.
 - Cambiare i guanti spesso e ogni volta che entrano in contatto con gli index primer o i campioni.

- Rimuovere le provette di index primer inutilizzate dall'area di lavoro.
- Non ricollocare i reagenti nelle provette di conservazione dopo averli utilizzati in una provetta in striscia, vaschette o serbatoi.
- Miscelare i campioni con una pipetta e centrifugare la piastra ove indicato.
- Utilizzare uno shaker per micropiastre. Non agitare le piastre.
- Non scambiare i componenti dei saggi appartenenti a diversi lotti di kit di reagente. I lotti dei kit di reagente sono identificati dall'etichetta sulla scatola del kit di reagente e sul foglio dei lotti principale.
- Per evitare che le nucleasi e i prodotti PCR contaminino i reagenti, la strumentazione, i campioni e le librerie, è necessario attivare prassi di laboratorio adeguate. La contaminazione da nucleasi e prodotti per PCR può causare risultati inesatti e inaffidabili.
- Per avere prestazioni del saggio e condizioni di conservazione ottimali, è necessario utilizzare tipi di piastra appropriati. Per il trasferimento della piastra attenersi a quanto riportato nelle [Istruzioni per l'uso alla pagina 37](#).
- Il mancato rispetto delle procedure descritte può causare risultati errati o una significativa riduzione della qualità delle librerie.
- A meno che non sia specificato un punto di arresto sicuro nelle [Istruzioni per l'uso alla pagina 37](#), procedere immediatamente alla fase successiva.
- Conservare i reagenti o i componenti del saggio alla temperatura specificata nelle aree designate per la pre-amplificazione e per la post-amplificazione.
- Non conservare i reagenti in un'unità di stoccaggio antibrina o negli scomparti dello sportello del frigorifero.
- Non congelare i reagenti contenenti microsfere (LNB1, SPB e SMB).
- Non utilizzare reagenti conservati in modo improprio.
- Non utilizzare procedure di miscelazione e manipolazione diverse da quelle specificate per ciascun reagente. La miscelazione inadeguata o l'eccessivo utilizzo del vortex sui reagenti può causare risultati dei campioni errati.
- ERA1-B e TCB1 possono presentare particolari correlati al prodotto. Seguire le linee guida specifiche per la manipolazione di ciascun reagente.
- Preparare le miscele master al momento ed eliminare il volume rimanente dopo l'uso.
- Per le fasi di lavaggio, preparare sempre al momento la soluzione di etanolo all'80% con RNase/DNase-free water. L'etanolo può assorbire acqua dall'aria; questo potrebbe influire sui risultati. Smaltire l'etanolo all'80% dopo l'uso in conformità alle normative locali, nazionali e/o federali.
- Trasferire il volume specificato di eluato. Trasferire un volume di eluato inferiore a quanto specificato durante le fasi di eluizione potrebbe influire sui risultati.
- Per il sonificatore a ultrasuoni, attenersi alle seguenti linee guida. Assicurarsi di seguire le istruzioni del produttore.

- Caricare il gDNA nella provetta del sonificatore a ultrasuoni lentamente per evitare di creare bolle. Bolle eccessive o un vuoto d'aria nella provetta dell'eluente possono causare una frammentazione incompleta.
- Effettuare l'erogazione nelle provette del sonificatore a ultrasuoni lentamente ed evitare spruzzi.
- Durante la rimozione del DNA frammentato, per evitare lo spostamento del fluido e la perdita di campione, non inserire la punta della pipetta sul fondo della provetta del sonificatore a ultrasuoni.
- Non pipettare meno di 2 µl di input di campione.
- Non utilizzare una vaschetta per dispensare i reagenti per le fasi che richiedono meno di 10 µl di materiale da aggiungere a ciascun pozzetto del campione.
- Quando si trasferiscono i campioni di gDNA frammentato dalle provette del sonificatore a ultrasuoni alla piastra Preparazione librerie (LP) utilizzare una pipetta dalla punta sottile.
- Usare solo adattatori UMI.
- Non usare adattatori SUA1.
- Assegnare diversi index primer a ciascun campione di libreria per identificare ciascuna libreria quando viene raggruppata per il sequenziamento su una singola cella a flusso.
- È possibile utilizzare gli indici UPxx o gli indici CPxx.
- Non combinare gli index primer CPxx e UPxx nella stessa libreria.
- La mancata corrispondenza tra i campioni e gli index primer genera risultati errati dovuti alla mancata identificazione del campione. Prima di avviare la preparazione delle librerie, immettere gli ID dei campioni e assegnare gli indici in Modulo di analisi Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN). Durante la preparazione delle librerie, prendere nota degli ID dei campioni, dell'indicizzazione e dell'orientamento dei pozzetti della piastra per riferimento futuro.
- Sequenziare un massimo di 16 librerie di DNA per ogni cella a flusso. Sequenziare almeno sei librerie. Attenersi alle linee guida in [Numero delle librerie e selezione degli indici alla pagina 33](#).
- Dopo la fase di legame in [Target di cattura Uno alla pagina 52](#) e in [Target di cattura Due alla pagina 56](#), passare immediatamente alla fase di lavaggio per evitare che il pellet di microsfere si asciughi.
- Durante le fasi di lavaggio, rimuovere l'etanolo all'80% dal fondo dei pozzetti. Eventuale etanolo residuo potrebbe influire sui risultati.
- Per ottenere prestazioni ottimali del saggio, seguire il numero specificato di lavaggi indicato nelle [Istruzioni per l'uso alla pagina 37](#).
- Durante la procedura [Normalizzazione delle librerie alla pagina 62](#), per ottenere una densità di cluster coerente sulla cella a flusso, risospendere accuratamente il pellet di microsfere della libreria.
- Le librerie di DNA dello stesso campione sono arricchite con due diversi set di sonde, ma utilizzano lo stesso indice e devono essere sequenziate sulla stessa cella a flusso.
- I controlli positivi e il controllo senza template (NTC, No-Template Control) devono essere elaborati come un campione e suddivisi per l'arricchimento con entrambi i set di sonde.

Note sulla procedura

- Il flusso di lavoro di TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) può essere condotto secondo il seguente programma.
 - Giorno 1: frammentazione del DNA di campioni di gDNA, preparazione delle librerie e avvio della (prima) ibridazione notturna.
 - Giorno 2: arricchimento, normalizzazione delle librerie arricchite e caricamento delle librerie sullo strumento NextSeq 550Dx.
- Se non fosse possibile eseguire il flusso di lavoro di TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) secondo questo programma, all'interno del protocollo vengono specificati diversi punti di arresto sicuro. Se il protocollo non specificasse un punto di arresto sicuro, passare immediatamente al passaggio successivo.
- Le librerie derivate dal DNA sono suddivise in pozzetti separati per l'arricchimento simultaneo con il set di sonde OPD2 e il set di sonde OPD3. I controlli positivi e gli NTC devono seguire la stessa procedura.
 - Utilizzare i componenti di arricchimento TruSight Oncology Comp (n. codice 20031123, n. codice 20031121) con OPD2 di TruSight Oncology Comp Content Set (n. codice 20031122). Le librerie arricchite con OPD2 sono indicate come librerie di DNA.
 - Utilizzare i componenti di arricchimento TruSight Oncology Comp HRD (n. codice 20140116, n. codice 20140115) con OPD3 di TruSight Oncology Comp HRD Content Set (n. codice 20140117). Le librerie arricchite con OPD3 sono indicate come librerie di DNA HRD.
 - Le tabelle di preparazione della miscela master includono il volume in eccesso per garantire che ci sia un volume sufficiente per il numero di campioni da elaborare.
 - Utilizzare acqua di grado molecolare priva di nucleasi.
 - Dopo l'aggiunta dei reagenti, risciacquare la punta aspirando ed erogando una volta nel pozzetto appropriato della piastra, se non diversamente specificato nella procedura.
 - Per temperatura ambiente si intende la temperatura compresa tra 15 °C e 30 °C.
 - Reagenti, campioni e librerie devono essere mantenuti al freddo in determinate fasi nelle Istruzioni per l'uso. Si intende la conservazione in ghiaccio o equivalente.

Programmi del ciclatore termico

- Effettuare la programmazione del ciclatore termico sulle apparecchiature di post-amplificazione prima di avviare il protocollo.
- Assicurarsi che le piastre PCR si adattino perfettamente al ciclatore termico.
- Utilizzare piastre raccomandate dal produttore del ciclatore termico.

Sigillatura e rimozione della sigillatura dalla piastra

- Sigillare sempre le piastre con un nuovo sigillo adesivo. Non riutilizzare i sigilli.

- Per sigillare la piastra, applicare con cura la copertura adesiva alla piastra utilizzando un cuneo o un rullo sigillante.
- Sigillare sempre la piastra a 96 pozzetti con un nuovo sigillo adesivo per piastre prima di passare alle fasi successive del protocollo.
 - Fasi di agitazione della piastra
 - Fasi di centrifugazione
 - Fasi del ciclatore termico
 - Ibridazioni
 - Conservazione a lungo termine
- Assicurarsi che i bordi e i pozzetti siano sigillati per ridurre il rischio di contaminazione incrociata e di evaporazione.
- Posizionare la piastra su una superficie piatta prima di rimuovere lentamente la sigillatura.
- Prima di rimuovere la sigillatura, se si nota la presenza di fluido o condensa sul sigillo o sulle pareti laterali dei pozzetti della piastra, centrifugare a $280 \times g$ per un minuto.
- Utilizzare sigilli adesivi per piastre che siano efficaci da $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ e adatti a piastre PCR skirted o semiskirted.

Apparecchiatura

- Prima di avviare il saggio, assicurarsi che il personale di laboratorio conosca le istruzioni del produttore per il funzionamento e la manutenzione di tutte le apparecchiature.

Tipo di piastra e trasferimento delle piastre

- Per avere prestazioni del saggio e condizioni di conservazione ottimali, è necessario utilizzare tipi di piastra appropriati.
- Quando si trasferiscono volumi tra le piastre, trasferire il volume specificato da ogni pozzetto di una piastra al pozzetto corrispondente della piastra di destinazione.
- Per trasferire campioni tra provette in striscia o piastre è possibile utilizzare pipette multicanale.
- Per agitare le piastre, attenersi alle seguenti linee guida.
 - Agitare le piastre usando uno shaker per piastre. Non agitarle utilizzando un vortex.
 - Agitare le piastre PCR a 1.200 giri/m.
 - Agitare le piastre MIDI a 1.800 giri/m.
 - Seguire le istruzioni del produttore per assicurarsi che lo shaker per piastre sostenga la piastra in modo saldo.

Centrifugazione

- Quando le istruzioni del protocollo indicano di centrifugare brevemente, centrifugare a $280 \times g$ per un minuto.
- Se si osserva del liquido sul sigillo o sui bordi di un pozzetto, centrifugare la piastra a $280 \times g$ per un minuto.

Manipolazione dei reagenti

- Richiudere bene tutte le provette di reagente subito dopo l'uso per limitare l'evaporazione e prevenire la contaminazione.
- Quando i reagenti non sono più necessari per una determinata procedura, riportarli alla temperatura di conservazione specificata.
- Seguire la preparazione dei reagenti che precede ogni sezione della procedura nelle [Istruzioni per l'uso alla pagina 37](#).
- Assicurarsi di preparare il volume di miscela master, miscela di eluizione e etanolo all'80% richiesto per il numero di campioni da elaborare.
- I volumi forniti nelle tabelle della miscela master e delle soluzioni contengono un volume in eccesso. I calcoli del volume in eccesso sono i seguenti.
 - [Tabella 13](#)
 - Volume di ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{numero di librerie}) \times (1,20)$.
 - Volume di ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{numero di librerie}) \times (1,20)$.
 - [Tabella 23](#)
 - Volume di EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{numero di librerie}) \times (1,364)$.
 - Volume di HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{numero di librerie}) \times (1,364)$.
 - [Tabella 24](#)
 - Volume di EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{numero di librerie}) \times (1,364)$.
 - Volume di HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{numero di librerie}) \times (1,364)$.
 - [Tabella 30](#)
 - Volume di LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{numero di librerie}) \times (2,0)$.
 - Volume di LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{numero di librerie}) \times (2,0)$.
 - [Tabella 31](#)
 - Volume di EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{numero di librerie}) \times (1,25)$.
 - Volume di HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{numero di librerie}) \times (1,25)$.

Set di adattatori

- Usare solo adattatori UMI.
- Gli adattatori SUA1 sono forniti ma non sono richiesti per il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

Manipolazione delle microsfere

- Nel saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) sono inclusi tre tipi di microsfere (SPB, SMB e LNB1). Assicurarsi che durante la procedura venga utilizzato il tipo di microsfere corretto.
- Eseguire il numero corretto di lavaggi per ciascun tipo di microsfere.
- Assicurarsi che le microsfere siano a temperatura ambiente prima dell'uso.
- Per garantire l'omogeneità, miscelare le microsfere per un minuto prima dell'uso.
- Quando si mescolano le microsfere con una pipetta, attenersi alle seguenti linee guida:
 - Utilizzare una pipetta e una punta di dimensioni adatte al volume da miscelare.
 - Impostare il volume in modo che sia pari a circa il 50-75% del volume del campione.
 - Pipettare lentamente senza rilasciare lo stantuffo.
 - Evitare di spruzzare e introdurre bolle d'aria.
 - Per rilasciare le microsfere dal pozzetto o dalla provetta, posizionare la punta della pipetta sopra il pellet ed erogare direttamente nel pellet.
 - Assicurarsi che il pellet di microsfere sia completamente in soluzione. La soluzione deve avere un aspetto marrone scuro e una consistenza omogenea.
 - Valutare se è presente un pellet di microsfere. Aspirare con attenzione la soluzione totale di microsfere del pozzetto nella punta e controllare il fondo dei pozzetti.
- Se le microsfere vengono aspirate nelle punte delle pipette durante le fasi di separazione magnetica, erogare nuovamente le microsfere nel pozzetto della piastra sul supporto magnetico. Attendere che il liquido sia trasparente (circa 2 minuti) prima di procedere alla fase successiva della procedura.
- Quando si lavano le microsfere:
 - Utilizzare il supporto magnetico raccomandato per la piastra.
 - Erogare il liquido direttamente sul pellet di microsfere in modo che le microsfere sul lato dei pozzetti si bagnino.
 - Tenere la piastra sul supporto magnetico finché la procedura non specifica di rimuoverla.
 - Non agitare la piastra mentre è sul supporto magnetico.
 - Mentre si trova sul supporto magnetico, non alterare il pellet di microsfere.
- Quando si lavano le microsfere o si rimuove il surnatante, angolare le punte delle pipette sul fondo dei pozzetti per evitare di creare un vuoto e aspirare la soluzione nei filtri delle punte.

Numero delle librerie e selezione degli indici

Prima di impostare la sessione, pianificare il numero di librerie di campioni e gli indici dei campioni per la sessione di sequenziamento. Le seguenti linee guida sul numero di campioni includono i controlli positivi, ma escludono gli NTC. Gli NTC devono essere aggiunti alla sessione programmata come campione aggiuntivo.

Gli index primer identificano in modo univoco ogni campione in modo che le librerie possano essere raggruppate per il sequenziamento su una cella a flusso. Gli indici vengono visualizzati nella schermata Create Run (Crea sessione) durante la configurazione della sessione sul Modulo di analisi Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN). Durante la preparazione delle librerie, aggiungere l'index primer a ciascuna libreria di campioni. *Usare una miscela di index primer diversa per ogni libreria di campioni.*

Le librerie indicizzate dello stesso campione sono suddivise in due arricchimenti con due diversi set di sonde. Le due librerie arricchite ottenute condividono lo stesso indice e devono essere sequenziate sulla stessa cella a flusso.

Consultare [Tabella 4](#) per le librerie minime e massime da sequenziare su una cella a flusso durante il sequenziamento.

Tabella 4 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Sequenziamento

Tipo di libreria	Enrichment	Minimo*	Massimo*
DNA	OPD2	3	8
DNA HRD	OPD3	3	8

*Gli NTC non contribuiscono alla complessità.

Per un uso ottimale dei reagenti durante il sequenziamento sullo strumento NextSeq 550Dx, sequenziare 8 librerie di DNA (OPD2) e, 8 librerie di DNA HRD (OPD3) per ogni cella a flusso.

Assicurarsi che gli index primer utilizzati con i campioni corrispondano agli indici selezionati per l'analisi con Modulo di analisi Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN). *Le discordanze potrebbero causare la segnalazione di risultati errati a causa della perdita dell'identificazione positiva del campione.*

Esistono due tipi di indici (UPxx e CPxx) nel saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

Quando si sequenzia il numero minimo di librerie (3 librerie di DNA e 3 librerie di DNA HRD), si applicano i seguenti requisiti:

- Non usare i set di indici CPxx.
- Per fornire una varietà sufficiente, è necessario utilizzare uno dei seguenti set di indici UPxx.
 - UP01, UP02 e UP03
 - UP04, UP05 e UP06
 - UP07, UP08 e UP09
 - UP10, UP11 e UP12

Ad esempio, alla prima libreria è assegnato UP01, alla seconda libreria UP02 e alla terza libreria UP03.

TruSight Oncology DNA Control v2

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) richiede TruSight Oncology DNA Control v2 come controllo positivo. Includere TruSight Oncology DNA Control v2 per ogni sessione di sequenziamento del DNA all'interno di un determinato evento di preparazione delle librerie. Per ogni sessione di sequenziamento pianificata, viene

preparato un controllo positivo unico. Consultare Foglietto illustrativo di TruSight Oncology DNA Control v2 (EU) per ulteriori informazioni.

La quantità di input di TruSight Oncology DNA Control v2 è di 2 µl.

Includere un NTC appropriato in ogni evento di preparazione delle librerie. L'NTC viene sequenziato ripetutamente all'interno di un evento di preparazione delle librerie. Attenersi alle seguenti linee guida per il controllo positivo e l'NTC:

- Preparare le librerie dai controlli positivi e dagli NTC in modo identico ai campioni. Il controllo positivo e l'NTC devono essere divisi per l'arricchimento con entrambi i set di sonde in modo identico ai campioni.
- Per il DNA NTC, utilizzare il TEB.
- I controlli positivi sono inclusi nel requisito massimo della libreria.
- Gli NTC non sono inclusi nel requisito minimo della libreria.
- Utilizzare gli indici UP per l'NTC quando si sequenzia il numero minimo di librerie.
- Poiché l'NTC viene sequenziato ripetutamente, l'indice selezionato per questo controllo non può essere ripetuto nell'evento di preparazione delle librerie.

Le tabelle in basso mostrano esempi di layout della piastra per il flusso di lavoro di preparazione delle librerie (Figura 1). Ogni colonna numerata rappresenta una singola sessione di sequenziamento. L'NTC viene sequenziato per ogni colonna o set di colonne.

Tabella 5 Piastra di preparazione delle librerie di una singola sessione con sei campioni di pazienti

	1	2	3	4	5	6
A	Controllo DNA Pos	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto
B	DNA 1	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto
C	DNA 2	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto
D	DNA 3	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto
E	DNA 4	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto
F	DNA 5	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto
G	DNA 6	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto
H	DNA NTC (Controllo senza template DNA)	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto

Tabella 6 Piastra di preparazione delle librerie di tre sessioni con 20 campioni di pazienti

	1	2	3	4	5	6	7
A	Controllo DNA Pos	Controllo DNA Pos	Controllo DNA Pos	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto
B	DNA 1	DNA 7	DNA 14	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto
C	DNA 2	DNA 8	DNA 15	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto
D	DNA 3	DNA 9	DNA 16	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto
E	DNA 4	DNA 10	DNA 17	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto
F	DNA 5	DNA 11	DNA 18	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto
G	DNA 6	DNA 12	DNA 19	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto
H	DNA NTC (Controllo senza templato DNA)	DNA 13	DNA 20	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto

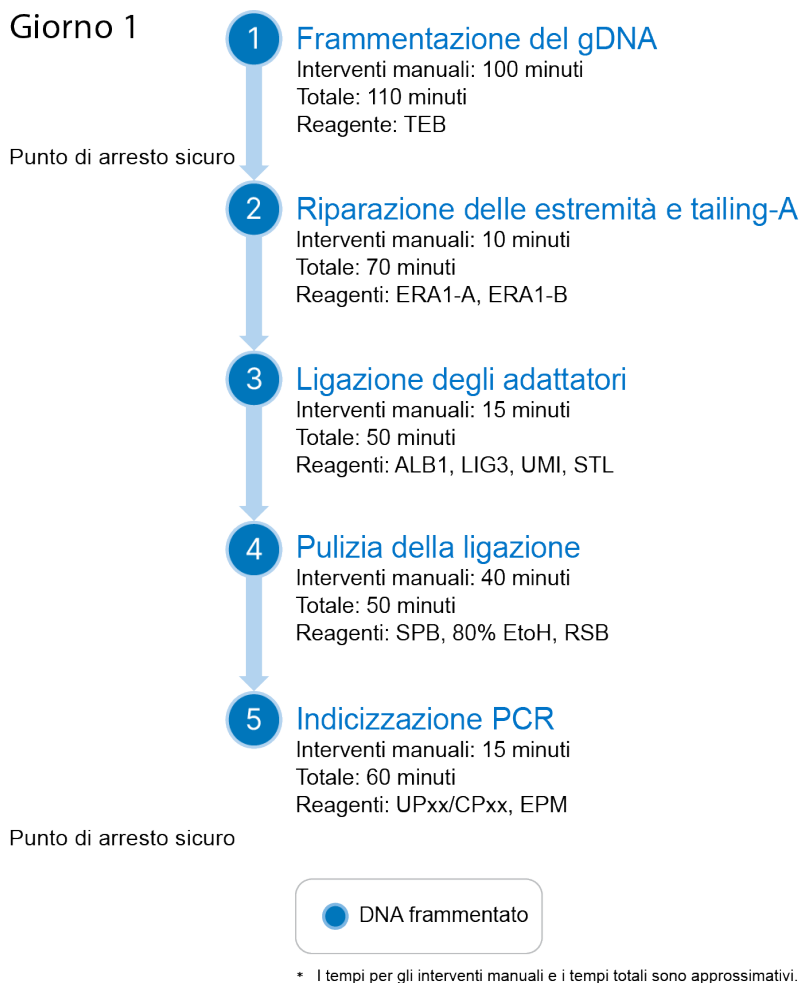
Istruzioni per l'uso

Una descrizione generale del flusso di lavoro TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) è mostrata nella [Figura 1](#) e nella [Figura 2](#).

Flusso di lavoro di preparazione delle librerie

La [Figura 1](#) illustra il flusso di lavoro per TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). I controlli positivi e gli NTC vengono elaborati in modo identico ai campioni. Fra i vari passaggi sono contrassegnati i punti di arresto sicuri. Prima di avviare il protocollo, immettere le informazioni sulla sessione e sul campione in Modulo di analisi Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN). Consultare *Guida al flusso di lavoro del modulo di analisi di Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)* (documento n. 200080937).

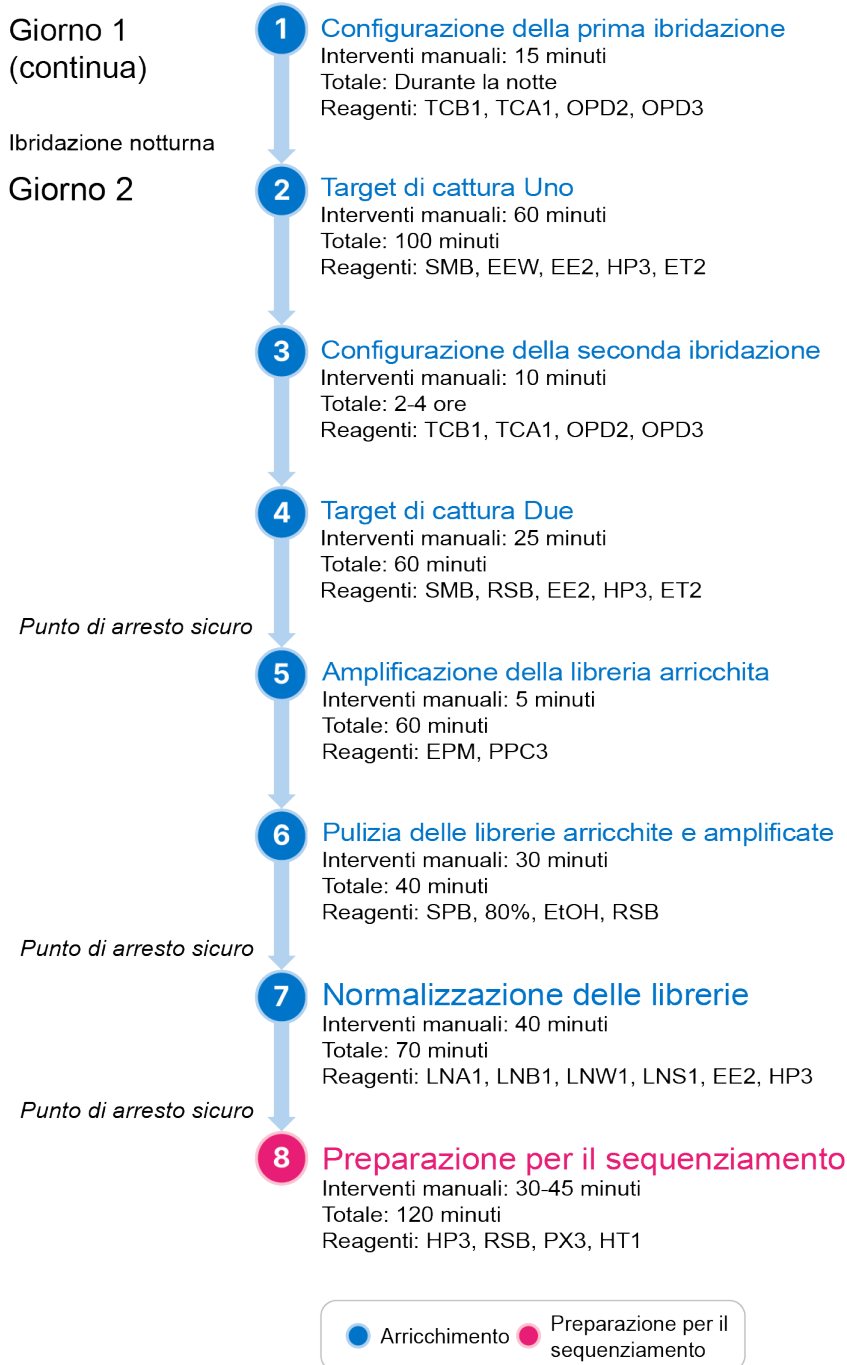
Figura 1 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Flusso di lavoro (Parte 1)



Flusso di lavoro di arricchimento

La [Figura 2](#) illustra il flusso di lavoro di arricchimento. Fra i vari passaggi sono contrassegnati i punti di arresto sicuri.

Figura 2 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Flusso di lavoro (Parte 2)



Programmazione dei ciclatori termici

Prima di avviare il saggio, salvare i seguenti programmi sui ciclatori termici post-amplificazione.

Tabella 7 Programmi post-amplificazione del ciclatore termico

Fase della procedura	Nome del programma	Temperatura del coperchio	Volume di reazione	Parametri del ciclatore termico
Indicizzazione PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	98 °C per 30 secondi 15 cicli di: 98 °C per 10 secondi 60 °C per 30 secondi 72 °C per 30 secondi 72 °C per 5 minuti - Mantenere la temperatura a 10 °C
Esecuzione della prima ibridazione	HYB1	100 °C	50 µl	95 °C per 10 minuti 85 °C per 2 min 30 secondi 75 °C per 2 min 30 secondi 65 °C per 2 min 30 secondi - Mantenere la temperatura a 57 °C per un periodo da 8 a 24 ore
Esecuzione della seconda ibridazione	HYB2	100 °C	50 µl	95 °C per 10 minuti 85 °C per 2 min 30 secondi 75 °C per 2 min 30 secondi 65 °C per 2 min 30 secondi - Mantenere la temperatura a 57 °C per un periodo da 1,5 a 4 ore
Amplificazione della libreria arricchita	EL-PCR	100 °C	50 µl	98 °C per 30 secondi 18 cicli di: 98 °C per 10 secondi 60 °C per 30 secondi 72 °C per 30 secondi 72 °C per 5 minuti - Mantenere la temperatura a 10 °C

Preparazione del protocollo

Questa preparazione è necessaria per eseguire i passaggi del protocollo che precedono il successivo punto di arresto sicuro.

**ATTENZIONE**

Tutte le procedure del flusso di lavoro richiedono un ambiente privo di RNasi/DNasi.

1. Decontaminare accuratamente le aree di lavoro con un detergente inibitore di RNasi/DNasi.
2. Impostare il sonificatore a ultrasuoni secondo le istruzioni del produttore.
3. Rimuovere i controlli DNA dal luogo deputato alla conservazione.
4. Rimuovere la provetta di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 8 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (n. codice 20031119)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
TEB	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Frammentazione del gDNA

Frammentazione del gDNA

Questo processo frammenta il gDNA e genera frammenti di dsDNA con estremità sporgenti al 3' o al 5'.

Preparazione

1. Seguire le raccomandazioni in [Estrazione, quantificazione e conservazione dell'acido nucleico alla pagina 24](#) per quantificare i campioni.
2. Preparare TEB: invertire o miscelare tramite vortex.

Procedura

Preparare la piastra

1. Apporre un'etichetta "LP" (Preparazione delle librerie) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
Se ci si ferma a un [PUNTO DI ARRESTO SICURO alla pagina 41](#), usare una piastra PCR.
2. Coprire e mettere da parte per l'uso in [Trasferimento del DNA frammentato alla pagina 41](#).

Diluizione del gDNA

1. Scongela i campioni di gDNA e i controlli del DNA a temperatura ambiente.
2. Pipettare ogni campione di gDNA 10 volte per miscelare.
3. Centrifugare brevemente la provetta per raccogliere le goccioline.
4. Invertire o miscelare tramite vortex il TEB.
5. Utilizzare il TEB per preparare ogni campione di gDNA in un volume finale di 52 µl. Consultare la tabella seguente per le quantità di input e le concentrazioni minime in base al tipo di campione.
 - Il saggio richiede una concentrazione minima di estrazione per consentire almeno 40 µl di TEB dei 52 µl di volume.

- Per il controllo del DNA, usare 2 µl in un volume finale di 52 µl.
- Per evitare perdite di campione, non pipettare meno di 2 µl di campione in questa diluizione.

Tipo di campione	Quantità di input (ng)	Concentrazione minima (ng/µl)
FFPE	40	3.33
Controllo	40	20

Frammentazione

1. Aggiungere 52 µl di ciascun campione di gDNA in un distinto pozzetto della provetta del sonificatore a ultrasuoni.



ATTENZIONE

Caricare il gDNA nella provetta lentamente, evitando la formazione di vuoti d'aria sul fondo. Per ulteriori informazioni, consultare [Saggio alla pagina 27](#) e le istruzioni del produttore.

2. Prendere nota dell'orientamento della striscia.
3. Frammentare il gDNA in frammenti con il sonificatore a ultrasuoni.

Trasferimento del DNA frammentato

1. Assicurarsi che il layout della piastra del campione e gli indici per ogni campione corrispondano alla sessione selezionata per l'analisi con Modulo di analisi TSO Comprehensive (EU, DRAGEN).
2. Per recuperare il campione, seguire le istruzioni del produttore del sonificatore a ultrasuoni. Per alcuni tipi di provette del sonificatore a ultrasuoni, potrebbe essere richiesto di eseguire la centrifugazione per consolidare il campione all'interno.
3. Per ogni campione di gDNA frammentato, utilizzare una pipetta con punte fini per eseguire tre trasferimenti di 16,7 µl in un pozzetto vuoto della piastra LP.
4. Applicare il sigillo adesivo alla piastra LP.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se fosse necessario fermarsi, applicare un sigillo adesivo alla piastra LP PCR e centrifugare a 280 × g per un minuto. Conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 7 giorni.

Preparazione del protocollo

Questa preparazione è necessaria per eseguire i passaggi del protocollo che precedono il successivo punto di arresto sicuro.

Assicurarsi che i programmi di post-amplificazione del ciclatore termico siano impostati. Consultare [Programmazione dei ciclatori termici alla pagina 39](#).

1. Preparare un portaghiaccio o prodotto equivalente.

2. Rimuovere le provette di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 9 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (n. codice 20031118)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
ERA1-A	Tra -25 °C e -15 °C	Conservare al freddo.	Riparazione delle estremità e tailing-A
ERA1-B	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Riparazione delle estremità e tailing-A
ALB1	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Ligazione degli adattatori
LIG3	Tra -25 °C e -15 °C	Conservare al freddo.	Ligazione degli adattatori
UMI (tappo bianco)	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Ligazione degli adattatori
STL	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Ligazione degli adattatori
EPM	Tra -25 °C e -15 °C	Conservare al freddo.	Indicizzazione PCR

Tabella 10 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (n. codice 20031119)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
SPB (etichetta verde chiaro)	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente per 30 minuti.	Pulizia della ligazione
RSB	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Pulizia della ligazione

Tabella 11 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (n. codice 20031120)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
UPxx	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare le provette di index primer appropriate a temperatura ambiente.	Indicizzazione PCR

Tabella 12 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (n. codice 20031126)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
CPxx	Tra -25 °C e -15 °C	Scongela le provette di index primer appropriate a temperatura ambiente.	Indicizzazione PCR

Riparazione delle estremità e tailing-A

Questo processo ripara le estremità sporgenti risultanti dalla frammentazione trasformandole in estremità con coda A sporgente usando una miscela master end repair A-tailing (ERA1).

L'attività esonucleasica dal 3' al 5' di questo mix rimuove le estremità sporgenti al 3', mentre l'attività della polimerasi dal 5' al 3' riempie le estremità sporgenti al 5'. Durante questa reazione, le estremità 3' presentano coda A per impedire che si leghino a vicenda durante la reazione di ligazione dell'adattatore.

Preparazione

1. Preriscaldare due incubatori per microcampioni con inserti di blocco termico MIDI nel modo descritto di seguito.
 - Preriscaldare un incubatore per microcampioni a 30 °C.
 - Preriscaldare un incubatore per microcampioni a 72 °C.
2. Preparare i seguenti reagenti:
 - ERA1-A: centrifugare brevemente, quindi pipettare per miscelare. Conservare al freddo.
 - ERA1-B: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente. Verificare la presenza di precipitati. Se presenti, scaldare la provetta a 37 °C, quindi pipettare per miscelare fino al dissolvimento dei precipitati.
3. Preparare la miscela master ERA1 in una provetta da microcentrifuga.

Tabella 13 Miscela master ERA1*

Componente miscela master	4 librerie	8 librerie	16 librerie	24 librerie
ERA1-B	35 µl	69 µl	138 µl	207 µl
ERA1-A	13,5 µl	27 µl	54 µl	81 µl

*Questa tabella include il volume in eccesso. Per i calcoli, consultare [Manipolazione dei reagenti alla pagina 32](#).

4. Pipettare lentamente 10 volte per garantire l'omogeneità, quindi centrifugare brevemente. Conservare al freddo la miscela master ERA1.
5. Selezionare una delle seguenti opzioni per preparare la piastra:
 - Se i campioni si trovano in una piastra MIDI, preparare come segue.
 - a. Rietichettare la piastra MIDI con l'indicazione "LP2" (Preparazione delle librerie 2).

- b. Se alcuni campioni sono in piastre MIDI separate, spostare tutti i campioni in pozzetti separati della stessa piastra MIDI in base al layout della piastra.
- Se la piastra è congelata, prepararla come segue.
 - a. Scongela la piastra PCF PCR a temperatura ambiente.
 - b. Centrifugare la piastra a 280 × g per un minuto.
 - c. Pipettare 10 volte per miscelare.
 - d. Apporre un'etichetta "LP2" (Preparazione delle librerie 2) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
 - e. Trasferire tutti i 50 µl di ciascun campione dalla piastra LP PCR al pozzetto corrispondente della piastra LP2 MIDI.
 - f. Eliminare la piastra LP PCR.

Procedura

1. Aggiungere 10 µl di miscela master ERA1 a ciascun pozzetto della piastra LP2 MIDI.
2. Eliminare la miscela master ERA1 rimanente.
3. Applicare il sigillo adesivo alla piastra LP2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
4. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
5. Incubare nell'incubatore per microcampioni preriscaldato a 30 °C per 30 minuti.
6. Trasferire immediatamente in un secondo incubatore per microcampioni preriscaldato.
7. Incubare a 72 °C per 20 minuti.
8. Conservare la piastra LP2 MIDI al freddo per 5 minuti.

Ligazione degli adattatori

Questo processo lega gli adattatori alle estremità dei frammenti di gDNA.

Preparazione



ATTENZIONE

Usare solo adattatori UMI. Gli adattatori SUA1 sono forniti ma non sono richiesti per il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

1. Preparare i seguenti reagenti:
 - ALB1: miscelare tramite vortex per almeno 10 secondi, quindi centrifugare brevemente.
 - LIG3: centrifugare brevemente, quindi pipettare per miscelare. Conservare al freddo.
 - UMI: miscelare tramite vortex per almeno 10 secondi, quindi centrifugare brevemente.
 - STL: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.

Procedura

1. Rimuovere la piastra LP2 MIDI dal ghiaccio o materiale equivalente.
2. Aggiungere 60 µl di ALB1 a ciascun pozzetto del campione della piastra LP2 MIDI. ALB1 è una soluzione viscosa. Pipettare lentamente per ridurre al minimo la formazione di bolle.
3. Dispensare 5 µl di LIG3 a ciascun pozzetto del campione.
4. Aggiungere 10 µl di UMI (tappo bianco) a ciascun pozzetto del campione.
5. Applicare il sigillo adesivo alla piastra LP2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
6. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
7. Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti.
8. Miscelare STL tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
9. Aggiungere 5 µl di STL a ciascun pozzetto del campione della piastra LP2 MIDI.
10. Applicare il sigillo adesivo alla piastra LP2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
11. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.

Pulizia della ligazione

Questo processo utilizza SPB per purificare i frammenti di gDNA legati all'adattatore e rimuovere i prodotti indesiderati. Le microsfere vengono lavate due volte con etanolo all'80% preparato al momento. I campioni legati all'adattatore vengono eluiti con RSB.

Preparazione

1. Preparare i seguenti reagenti:
 - SPB: verificare che le microsfere siano rimaste a temperatura ambiente per 30 minuti.
 - RSB: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
2. Preparare al momento una soluzione all'80% di EtOH in una provetta conica da 15 o 50 ml.

Tabella 14 Preparare al momento etanolo all'80%

Reagente	4 librerie	8 librerie	16 librerie	24 librerie
100% etanolo puro	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Miscelare l'EtOH all'80% preparato al momento tramite vortex.
4. Preparare il magnete.

Procedura

Legame

1. Miscelare tramite vortex l'SPB per un minuto per risospendere le microsfere.
2. Aggiungere immediatamente 112 µl di SPB a ciascun pozzetto del campione nella piastra LP2 MIDI.
Se si utilizzasse una vaschetta per dispensare SPB, includere un fattore in eccesso di 1,15 quando si aliquota sufficiente materiale per campione. Dopo aver aggiunto SPB a ogni pozzetto del campione, eliminare il materiale rimanente.
3. Applicare il sigillo adesivo alla piastra LP2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
4. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
5. Incubare a temperatura ambiente per cinque minuti.
6. Posizionare la piastra LP2 MIDI sul supporto magnetico per 10 minuti.
7. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.

Lavaggio

1. Lavare le microsfere come descritto di seguito.
 - a. Tenere la piastra LP2 MIDI sul supporto magnetico e aggiungere a ciascun pozzetto 200 µl di EtOH all'80% preparato al momento.
 - b. Attendere 30 secondi.
 - c. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.
2. Lavare le microsfere una **seconda** volta.
3. Con una pipetta dalla punta sottile, rimuovere ed eliminare l'etanolo residuo da ciascun pozzetto.
4. Eliminare l'EtOH all'80% non utilizzato.

Eluizione

1. Rimuovere la piastra LP2 MIDI dal supporto magnetico.
2. Invertire o miscelare tramite vortex l'RSB.
3. Aggiungere 27,5 µl di RSB a ciascun pozzetto del campione.
4. Applicare il sigillo adesivo alla piastra LP2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
5. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
6. Incubare a temperatura ambiente per due minuti.
7. Posizionare la piastra LP2 MIDI su un supporto magnetico per 2 minuti.

8. Apporre un'etichetta "LS" (Campioni di libreria) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
9. Trasferire 25 µl di ogni eluato dalla piastra LP2 MIDI al pozzetto corrispondente della piastra LS PCR.
10. Eliminare la piastra LP2 MIDI vuota.

Indicizzazione PCR

In questa fase, i frammenti della libreria vengono amplificati utilizzando primer che aggiungono sequenze di indice per il multiplex campioni. Il prodotto risultante contiene la libreria completa di frammenti di DNA affiancati da adattatori necessari per la generazione di cluster.

Preparazione

1. Preparare i seguenti reagenti:
 - EPM: mantenere al freddo.
 - UPxx: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - CPxx: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
2. Assicurarsi che gli indici per ciascun campione corrispondano alla sessione pianificata in Modulo di analisi TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) durante la configurazione della sessione. Assicurarsi di seguire le istruzioni relative alla selezione degli indici in [Numero delle librerie e selezione degli indici alla pagina 33](#).



ATTENZIONE

Le discordanze tra campioni e index primer causano la segnalazione di risultati errati a causa della perdita dell'identificazione positiva del campione.

Procedura

1. Aggiungere 5 µl dell'index primer appropriato (UPxx o CPxx) al pozzetto del campione corrispondente nella piastra LS PCR in base agli indici selezionati.



ATTENZIONE

Maneggiare e aprire solo una provetta di index primer alla volta. Richiudere ogni provetta di indice con un tappo nuovo immediatamente dopo l'uso. Non combinare gli index primer tra loro.

2. Miscelare l'EPM tramite vortex per 5 secondi, quindi centrifugare brevemente.
3. Aggiungere 20 µl di EPM a ciascun pozzetto del campione.
4. Applicare il sigillo adesivo alla piastra LS PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
5. Agitare a 1.200 giri/min per un minuto.
6. Ricollocare i reagenti di pre-amplificazione nel luogo deputato alla conservazione.

**ATTENZIONE**

Eseguire tutti i passaggi successivi in un'area post-amplificazione per evitare il carry-over del prodotto dell'amplificazione.

7. Centrifugare la piastra LS PCR a 280 × g per un minuto.
8. Posizionare sul ciclatore termico post amplificazione preprogrammato ed eseguire il programma I-PCR. Consultare [Programmazione dei ciclatori termici alla pagina 39](#).
Se si prosegue con [Configurazione della prima ibridazione alla pagina 49](#), seguire le istruzioni di scongelamento per i reagenti nella sezione Preparazione delle fasi del protocollo.
9. Al termine del programma I-PCR, centrifugare la piastra LS PCR a 280 × g per un minuto.
10. Rietichettare la piastra apponendo l'indicazione "ALS" (Campioni di libreria amplificati).

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se è necessario fermarsi, centrifugare conservare la piastra ALS PCR a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 30 giorni.

Preparazione del protocollo

Questa preparazione è necessaria per eseguire i passaggi del protocollo che precedono l'ibridazione durante la notte.

1. Assicurarsi che i programmi di post-amplificazione del ciclatore termico siano impostati. Consultare [Programmazione dei ciclatori termici alla pagina 39](#).
2. Rimuovere le provette di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 15 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20031123) in aggiunta a TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20140116)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
TCB1	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Configurazione della prima ibridazione

Tabella 16 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20031121) in aggiunta a TruSight Oncology Comp a HRD Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20140115)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
TCA1	Tra -25 °C e -15 °C	Scongela a temperatura ambiente.	Configurazione della prima ibridazione

Tabella 17 TruSight Oncology Comp Content Set Box (n. codice 20031122)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
OPD2 (tappo bianco)	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Configurazione della prima ibridazione

Tabella 18 TruSight Oncology Comp HRD Content Set Box (n. codice 20140117)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
OPD3 (tappo blu)	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Configurazione della prima ibridazione

Configurazione della prima ibridazione

Durante questo processo, due pool di oligonucleotidi (OPD2 e OPD3) si ibridano con le librerie di gDNA preparate in [Indicizzazione PCR alla pagina 47](#). L'arricchimento di regioni mirate richiede due fasi di ibridazione. Nella prima ibridazione, gli oligonucleotidi si ibridano alle librerie gDNA durante la notte (da 8 ore a 24 ore).

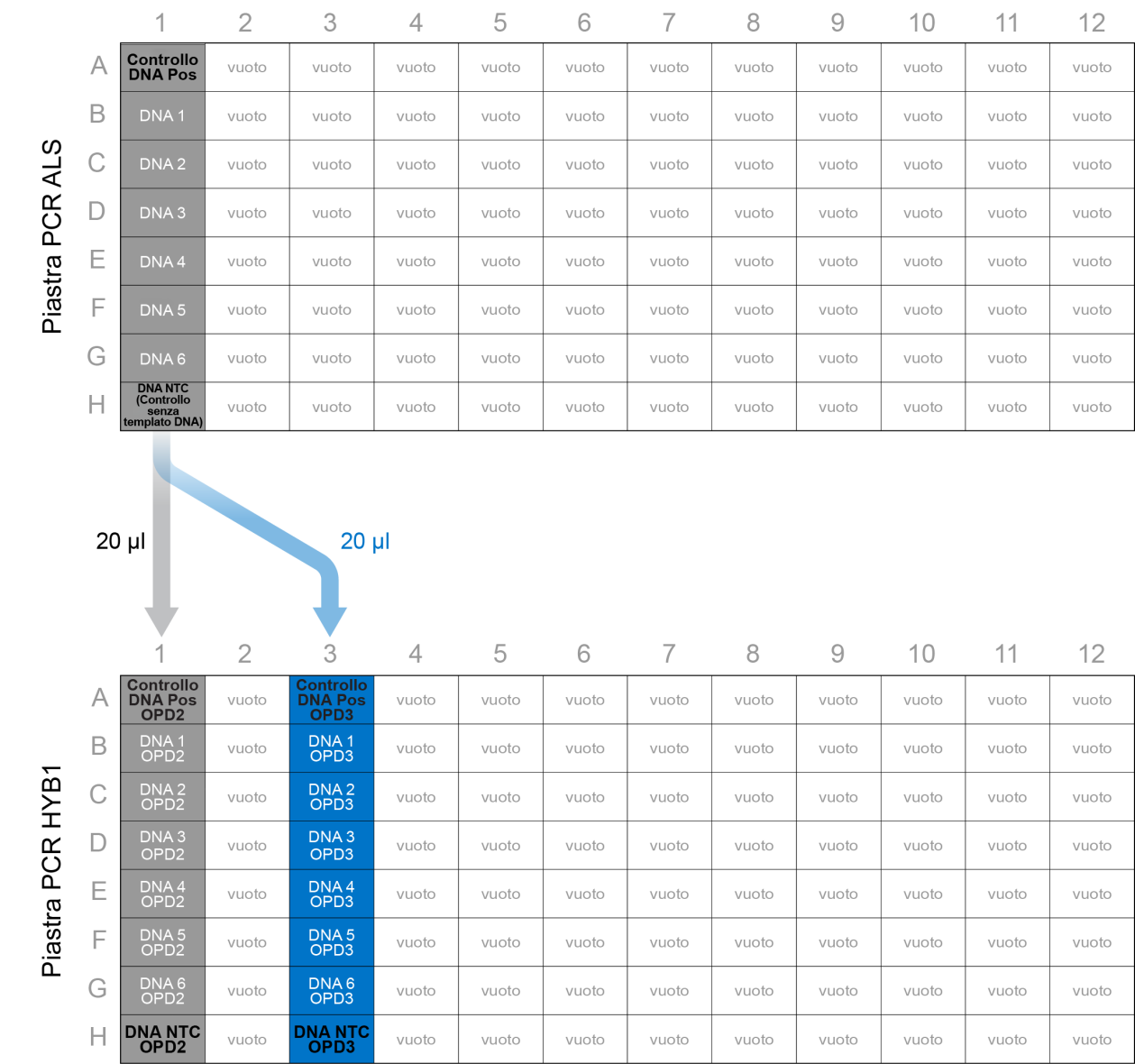
Preparazione

- Preparare i seguenti reagenti:
 - TCB1: scaldare la provetta a 37 °C per cinque minuti. Miscelare tramite vortex per 10 secondi, quindi centrifugare brevemente.
 - TCA1: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - OPD2: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - OPD3: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- Se la piastra ALS PCR è stata conservata, scongelarla a temperatura ambiente, quindi centrifugare a 280 × g per un minuto. Pipettare per miscelare.
- Apporre un'etichetta "HYB1" (Ibridazione 1) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.

Procedura

1. Trasferire 20 µl di ciascuna libreria gDNA dalla piastra ALS PCR al pozzetto corrispondente della piastra HYB1 PCR per l'arricchimento con le sonde OPD2. Includere controlli positivi e NTC per l'arricchimento con le sonde OPD2.
2. Trasferire un'ulteriore libreria di 20 µl di gDNA dalla piastra ALS PCR a un secondo pozzetto nella piastra HYB1 PCR per l'arricchimento con OPD3 sonde, come mostrato nella [Figura 3](#). Includere controlli positivi e NTC per l'arricchimento con le sonde OPD3.

Figura 3 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Layout della prima piastra di esempio di ibridazione



3. Applicare il sigillo adesivo alla piastra ALS PCR e metterla da parte.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.

4. Verificare TCB1 per la presenza di precipitati. Se presenti, scaldare nuovamente la provetta e agitarla tramite vortex fino a far dissolvere i cristalli.
5. Aggiungere 15 µl di TCB1 a ciascun pozzetto della libreria nella piastra HYB1 PCR.
6. Aggiungere 10 µl di TCA1 a ciascun pozzetto della libreria nella piastra HYB1 PCR.
7. Aggiungere le sonde.
Non combinare diversi tipi di sonde. Aggiungere un solo set di sonde per pozzetto.
 - **[Pozzetti della libreria di DNA]** – Aggiungere 5 µl di OPD2 (tappo bianco) a ciascuna libreria derivata dal DNA.
 - **Pozzetti della libreria di DNA HRD** – Aggiungere 5 µl di OPD3 (tappo blu) a ciascuna libreria derivata dal DNA per l'arricchimento HRD.
8. Applicare il sigillo adesivo alla piastra HYB1 PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
9. Agitare a 1.200 giri/min per due minuti.
10. Posizionare sul ciclatore termico ed eseguire il programma HYB1.
Consultare [Programmazione dei ciclatori termici alla pagina 39](#).
11. Ibridare a 57 °C per un minimo di 8 ore e fino a un massimo di 24 ore.
12. Ricollocare i reagenti di ibridazione nel luogo deputato alla conservazione.

Preparazione del protocollo

Questa preparazione è necessaria per eseguire i passaggi del protocollo che precedono il successivo punto di arresto sicuro.

All'inizio del secondo giorno, rimuovere le provette di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 19 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20031123) in aggiunta TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20140116)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
SMB (etichetta blu scuro)	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente per 30 minuti.	Target di cattura Uno Target di cattura Due
ET2	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Target di cattura Uno Target di cattura Due
HP3	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Target di cattura Uno Target di cattura Due Normalizzazione delle librerie
TCB1	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Configurazione della seconda ibridazione

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
RSB	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Target di cattura Due Pulizia delle librerie arricchite e amplificate

Tabella 20 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20031121) in aggiunta a TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20140115)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
EE2	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Target di cattura Uno Target di cattura Due Normalizzazione delle librerie
EEW	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Target di cattura Uno
TCA1	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Configurazione della seconda ibridazione

Tabella 21 TruSight Oncology Comp Content Set Box (n. codice 20031122)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
OPD2 (tappo bianco)	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Configurazione della seconda ibridazione

Tabella 22 TruSight Oncology Comp HRD Content Box (n. codice 20140117)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
OPD3 (tappo blu)	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Configurazione della seconda ibridazione

Target di cattura Uno

Questa fase utilizza SMB per catturare le sonde ibridate sulle regioni di interesse target. Le microsfere vengono lavate tre volte con EEW. Le librerie arricchite vengono eluite utilizzando una miscela di eluizione EE2 + HP3 preparata al momento e neutralizzata con ET2.

Preparazione

1. Preriscaldare un incubatore per microcampioni con un inserto di blocco termico MIDI a 57 °C.
2. Preparare i seguenti reagenti:
 - EEW: miscelare tramite vortex per un minuto.
 - EE2: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - HP3: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.

- SMB: verificare che le microsfere siano rimaste a temperatura ambiente per 30 minuti. Per questa procedura, assicurarsi di utilizzare **SMB** e non SPB.
 - ET2: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
3. Preparare al momento la miscela di eluizione EE2 + HP3 in una provetta per microcentrifuga.

Tabella 23 Miscela di eluizione EE2 + HP3 per target di cattura Uno*

Componente della miscela di eluizione	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
EE2	228 µl	456 µl	684 µl	1.368 µl
HP3	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

*Questa tabella include il volume in eccesso. Per i calcoli, consultare [Manipolazione dei reagenti alla pagina 32](#).

4. Miscelare tramite vortex la miscela di eluizione EE2 + HP3, quindi centrifugare brevemente. Mettere da parte per la fase [Eluizione alla pagina 54](#).
5. Apporre un'etichetta "CAP1" (Cattura 1) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
6. Preparare il magnete.

Procedura

Legame

1. Rimuovere la piastra HYB1 PCR dal ciclatore termico.
2. Centrifugare la piastra HYB1 PCR a 280 × g per un minuto.
3. Miscelare tramite vortex l'SMB per un minuto per risospendere le microsfere.
Se sono presenti precipitato o pellet di microsfere, assicurarsi di raggiungere la temperatura ambiente, pipettare in alto e in basso per rilasciare il pellet, quindi miscelare tramite vortex per risospendere.
4. Aggiungere immediatamente 150 µl di SMB a ciascun pozzetto della libreria della piastra CAP1 MIDI.
Se per dispensare SMB si utilizzano vaschette, includere un fattore di eccesso di 1,05 quando si aliquota sufficiente materiale per campione.
5. Dopo aver aggiunto SMB a ogni pozzetto del campione, eliminare il materiale rimanente.
6. Impostare la pipetta a 50 µl e trasferire l'intero volume di ciascuna libreria dalla piastra HYB1 PCR al pozzetto corrispondente della piastra CAP1 MIDI.
7. Eliminare la piastra HYB1 PCR vuota.
8. Applicare il sigillo adesivo alla piastra CAP1 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
9. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
10. Incubare nell'incubatore per microcampioni preriscaldato a 57 °C per 25 minuti.
11. Posizionare la piastra CAP1 MIDI su un supporto magnetico per 2 minuti.
12. Tenere la piastra sul supporto magnetico. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.

**ATTENZIONE**

Passare immediatamente alla fase successiva ([Lavaggio alla pagina 54](#)). Non lasciare il pellet di microsfere a riposo per un periodo di tempo eccessivo senza la presenza di liquido.

Lavaggio

1. Lavare le microsfere come descritto di seguito.
 - a. Rimuovere la piastra CAP1 MIDI dal supporto magnetico.
 - b. Aggiungere 200 µl di EEW a ciascun pozzetto.
 - c. Impostare il volume della pipetta su 150 µl e pipettare almeno 10 volte per miscelare. Assicurarsi che tutte le microsfere siano risospese.

Assicurarsi che non siano presenti pellet di microsfere; per farlo, aspirare attentamente la soluzione totale di microsfere del pozzetto nella punta. Ispezionare visivamente il fondo di ciascun pozzetto. Se fosse presente un pellet di microsfere, disporre ad angolo la punta della pipetta verso il pellet durante le fasi di lavaggio per farlo fuoriuscire. Assicurarsi che il pellet di microsfere sia completamente immerso in soluzione. La soluzione deve avere un aspetto marrone scuro e una consistenza omogenea.
 - d. Applicare il sigillo adesivo alla piastra CAP1 MIDI.

Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
 - e. Agitare a 1.800 giri/min per quattro minuti.
 - f. Incubare in un incubatore per microcampioni a 57 °C per cinque minuti.
 - g. Posizionare la piastra CAP1 MIDI su un supporto magnetico per 2 minuti.
 - h. Tenere la piastra sul supporto magnetico. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.
2. Lavare le microsfere una **seconda** volta.
3. Lavare le microsfere una **terza** volta.
4. Con una pipetta dalla punta sottile, rimuovere ed eliminare l'EEW residuo da ciascun pozzetto.

Eluizione

1. Rimuovere la piastra CAP1 MIDI dal supporto magnetico.
2. Miscelare tramite vortex la miscela di eluizione EE2 + HP3 preparata al momento, quindi centrifugare brevemente.
3. Aggiungere 17 µl di miscela di eluizione EE2 + HP3 a ciascun pozzetto della libreria nella piastra CAP1 MIDI.
4. Eliminare la miscela di eluizione EE2 + HP3 rimanente.
5. Applicare il sigillo adesivo alla piastra CAP1 MIDI.

Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
6. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
7. Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.

8. Apporre un'etichetta "ELU1" (Eluizione 1) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
9. Miscelare l'ET2 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
10. Aggiungere 5 µl di ET2 a ciascun pozzetto della libreria corrispondente nella nuova piastra ELU1 PCR.
11. Trasferire con attenzione 15 µl di eluato da ogni pozzetto della libreria della piastra CAP1 MIDI al pozzetto corrispondente della piastra ELU1 PCR.
12. Eliminare la piastra CAP1 MIDI vuota.
13. Applicare il sigillo adesivo alla piastra ELU1 PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
14. Agitare a 1.200 giri/min per due minuti.
15. Riportare l'EEW nel luogo deputato alla conservazione.

Configurazione della seconda ibridazione

Questo passaggio lega le regioni target delle librerie gDNA arricchite alle sonde di cattura una seconda volta. La seconda ibridazione assicura un'alta specificità delle regioni catturate. Per garantire un arricchimento ottimale delle librerie, eseguire la seconda fase di ibridazione a 57 °C per un minimo di 1,5 ore e fino a un massimo di 4 ore.

Preparazione

1. Preparare i seguenti reagenti:
 - TCB1: scaldare la provetta a 37 °C per cinque minuti. Miscelare tramite vortex per 10 secondi, quindi centrifugare brevemente.
 - TCA1: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - OPD2: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - OPD3 – Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.

Procedura

1. Verificare che non siano presenti precipitati nel TCB1. Se presenti, scaldare nuovamente la provetta e miscelarla tramite vortex fino a far dissolvere i cristalli.
2. Aggiungere 15 µl di TCB1 a ciascun pozzetto della libreria nella piastra ELU1 PCR.
3. Aggiungere 10 µl di TCA1 a ciascun pozzetto della libreria.
4. Aggiungere la stessa sonda utilizzata durante la prima ibridazione a ciascun pozzetto. Aggiungere un solo set di sonde per pozzetto.
Non combinare diversi tipi di sonde.
 - **[Pozzetti della libreria di DNA]** – Aggiungere 5 µl di OPD2 (tappo bianco) a ogni libreria derivata dal DNA.

- **Pozzetti della libreria di DNA HRD** – Aggiungere 5 µl di OPD3 (tappo blu) a ogni libreria derivata dal DNA per l'arricchimento HRD.
5. Applicare il sigillo adesivo alla piastra ELU1 PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
 6. Agitare a 1.200 giri/min per due minuti.
 7. Posizionare su un ciclatore termico ed eseguire il programma HYB2.
Consultare [Programmazione dei ciclatori termici alla pagina 39](#).
 8. Ibridare a 57 °C per un minimo di 1.5 ore e fino a un massimo di 4 ore.
 9. Ricollocare i reagenti di ibridazione nel luogo deputato alla conservazione.

Target di cattura Due

Questa fase utilizza SMB per catturare le sonde ibridate sulle regioni di interesse target. Le microsfere vengono lavate una volta con RSB. Le librerie arricchite vengono eluite utilizzando una miscela di eluizione EE2 + HP3 preparata al momento e neutralizzata con ET2.

Preparazione

1. Preriscaldare un incubatore per microcampioni con inserto di blocco termico MIDI a 57 °C.
2. Preparare i seguenti reagenti:
 - EE2: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - HP3: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - SMB: verificare che le microsfere siano rimaste a temperatura ambiente per 30 minuti.
Per questa procedura, assicurarsi di utilizzare **SMB** e non SPB.
 - RSB: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
 - ET2: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
3. Preparare al momento la miscela di eluizione EE2 + HP3 in una provetta per microcentrifuga.

Tabella 24 Miscela di eluizione EE2 + HP3 per target di cattura Due*

Componente della miscela di eluizione	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
EE2	228 µl	456 µl	684 µl	1.368 µl
HP3	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

*Questa tabella include il volume in eccesso. Per i calcoli, consultare [Manipolazione dei reagenti alla pagina 32](#).

4. Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente. Mettere da parte per la fase [Eluizione alla pagina 58](#).
5. Apporre un'etichetta "CAP2" (Cattura 2) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
6. Preparare il magnete.

Procedura

Legame

1. Rimuovere la piastra ELU1 PCR dal ciclatore termico.
2. Centrifugare la piastra ELU1 PCR a 280 × g per un minuto.
3. Miscelare tramite vortex l'SMB per un minuto per risospendere le microsfere.
4. Aggiungere immediatamente 150 µl di SMB a ciascun pozzetto della libreria della piastra CAP2 MIDI.
Se per dispensare SMB si utilizzano vaschette, includere un fattore di eccesso di 1,05 quando si aliquota sufficiente materiale per campione.
5. Dopo aver aggiunto SMB a ogni pozzetto del campione, eliminare il materiale rimanente.
6. Impostare la pipetta a 50 µl e trasferire l'intero volume di ciascuna libreria dalla piastra ELU1 PCR al pozzetto corrispondente della piastra CAP2 MIDI.
7. Eliminare la piastra ELU1 PCR vuota.
8. Applicare il sigillo adesivo alla piastra CAP2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
9. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
10. Incubare in un incubatore per microcampioni a 57 °C per 25 minuti.
Se si continua con [Amplificazione della libreria arricchita alla pagina 59](#), seguire le istruzioni di scongelamento dei reagenti nella sezione [Preparazione del protocollo](#).
11. Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
12. Tenere la piastra CAP2 MIDI sul supporto magnetico. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.



ATTENZIONE

Passare immediatamente alla fase successiva ([Lavaggio alla pagina 57](#)). Non lasciare il pellet di microsfere a riposo per un periodo di tempo eccessivo senza la presenza di liquido.

Lavaggio

1. Rimuovere la piastra CAP2 MIDI dal supporto magnetico.
2. Invertire o miscelare tramite vortex l'RSB.
3. Aggiungere 200 µl di RSB a ciascun pozzetto.
4. Applicare il sigillo adesivo alla piastra CAP2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
5. Agitare a 1.800 giri/min per quattro minuti.
6. Posizionare la piastra sul supporto magnetico per due minuti.
7. Tenere la piastra sul supporto magnetico. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.

8. Con una pipetta dalla punta sottile, rimuovere ed eliminare l'RSB residuo da ciascun pozzetto.

Eluizione

1. Rimuovere la piastra CAP2 MIDI dal supporto magnetico.
2. Miscelare tramite vortex la miscela di eluizione EE2 + HP3 preparata al momento, quindi centrifugare brevemente.
3. Aggiungere 22 µl di miscela di eluizione EE2 + HP3 a ciascun pozzetto della libreria nella piastra CAP2 MIDI.
4. Eliminare la miscela di eluizione EE2 + HP3 rimanente.
5. Applicare il sigillo adesivo alla piastra CAP2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
6. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
7. Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
8. Apporre un'etichetta "ELU2" (Eluizione 2) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
9. Miscelare l'ET2 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
10. Aggiungere 5 µl di ET2 a ciascun pozzetto della libreria corrispondente nella nuova piastra ELU2 PCR.
11. Trasferire con attenzione 20 µl di eluato da ogni pozzetto della libreria della piastra CAP2 MIDI al pozzetto corrispondente della piastra ELU2 PCR.
12. Eliminare la piastra CAP2 MIDI vuota.
13. Applicare il sigillo adesivo alla piastra ELU2 PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
14. Agitare a 1.200 giri/min per due minuti.
15. Riportare SMB, EE2, HP3, RSB e ET2 nel luogo deputato alla conservazione.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se fosse necessario fermarsi, centrifugare la piastra ELU2 PCR a 280 × g per un minuto e conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 7 giorni.

Preparazione del protocollo

Questa preparazione è necessaria per eseguire i passaggi del protocollo che precedono il successivo punto di arresto sicuro.

1. Preparare un portaghiaccio o prodotto equivalente.
2. Rimuovere le provette di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 25 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20031121) in aggiunta a TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20140115)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
PPC3	Tra -25 °C e -15 °C	Scongela a temperatura ambiente.	Amplificazione della libreria arricchita
EPM	Tra -25 °C e -15 °C	Conservare al freddo.	Amplificazione della libreria arricchita

Tabella 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20031123) in aggiunta a TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20140116)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
SPB (etichetta verde chiaro)	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente per 30 minuti.	Pulizia delle librerie arricchite e amplificate
RSB	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Pulizia delle librerie arricchite e amplificate Preparazione per il sequenziamento

Amplificazione della libreria arricchita

Tramite questo passaggio vengono utilizzati i primer per amplificare le librerie arricchite.

Preparazione

1. Se la piastra ELU2 fosse stata conservata, scongelarla a temperatura ambiente, quindi centrifugare a 280 × g per un minuto.

Procedura

1. Miscelare il PPC3 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
2. Aggiungere 5 µl di PPC3 a ciascun pozzetto della libreria della piastra ELU2 PCR.
3. Miscelare l'EPM tramite vortex per 5 secondi, quindi centrifugare brevemente.
4. Aggiungere 20 µl di EPM a ciascun pozzetto della libreria.
5. Applicare il sigillo adesivo alla piastra ELU2 PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
6. Agitare a 1.200 giri/min per due minuti.

7. Posizionare su un ciclatore termico ed eseguire il programma EL-PCR.
Consultare [Programmazione dei ciclatori termici alla pagina 39](#).
Se si continua con [Normalizzazione delle librerie alla pagina 62](#), seguire le istruzioni di scongelamento nella sezione [Preparazione del protocollo](#).
8. Riportare PPC3 ed EPM nel luogo deputato alla conservazione.

Pulizia delle librerie arricchite e amplificate

In questa fase si utilizza SPB per purificare le librerie arricchite da componenti di reazione indesiderati. Le microsfere vengono lavate due volte con etanolo all'80% preparato al momento. Le librerie vengono eluite con RSB.

Preparazione

1. Preparare i seguenti reagenti:
 - SPB: verificare che le microsfere siano rimaste a temperatura ambiente per 30 minuti. Per questa procedura, assicurarsi di utilizzare l'*SPB* e non l'*SMB*.
 - RSB: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
2. Preparare al momento una soluzione all'80% di etanolo in una provetta conica da 15 o 50 ml.

Tabella 27 Preparare al momento etanolo all'80%

Reagente	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
100% etanolo puro	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Miscelare l'EtOH all'80% preparato al momento tramite vortex.
4. Apporre un'etichetta "BIND2" (Legame di pulizia) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
5. Preparare il magnete.

Procedura

Legame

1. Rimuovere la piastra ELU2 PCR dal ciclatore termico.
2. Centrifugare la piastra ELU2 PCR a 280 × g per un minuto.
3. Miscelare tramite vortex l'*SPB* per un minuto per risospendere le microsfere.
4. Aggiungere immediatamente 110 µl di SPB a ciascun pozzetto della libreria della piastra BIND2 MIDI.
Se si utilizzasse una vaschetta per dispensare SPB, includere un fattore in eccesso di 1,15 quando si aliquota sufficiente materiale per campione. Dopo aver aggiunto SPB a ogni pozzetto del campione, eliminare il materiale rimanente.

5. Trasferire 50 µl di ciascuna libreria dalla piastra ELU2 PCR al pozzetto corrispondente della piastra BIND2 MIDI.
6. Eliminare la piastra ELU2 PCR vuota.
7. Applicare il sigillo adesivo alla piastra BIND2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
8. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
9. Incubare a temperatura ambiente per cinque minuti.
10. Posizionare la piastra BIND2 MIDI su un supporto magnetico per cinque minuti.
11. Mantenere la piastra sul supporto magnetico. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.

Lavaggio

1. Lavare le microsfere come descritto di seguito.
 - a. Mantenere la piastra BIND2 MIDI sul supporto magnetico e aggiungere a ciascun pozzetto 200 µl di EtOH all'80% preparato al momento.
 - b. Attendere 30 secondi.
 - c. Usare una pipetta P200 impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto senza alterare il pellet di microsfere.
2. Lavare le microsfere una **seconda** volta.
3. Con una pipetta dalla punta sottile, rimuovere ed eliminare l'etanolo residuo da ciascun pozzetto.
4. Eliminare l'EtOH all'80% non utilizzato.

Eluizione

1. Rimuovere la piastra BIND2 MIDI dal supporto magnetico.
2. Invertire o miscelare tramite vortex l'RSB.
3. Aggiungere 32 µl di RSB a ciascun pozzetto della libreria.
4. Applicare il sigillo adesivo alla piastra BIND2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
5. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
6. Incubare a temperatura ambiente per due minuti.
7. Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
8. Apporre un'etichetta "PL" (Librerie purificate) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
9. Trasferire 30 µl di ogni eluato dalla piastra BIND2 MIDI al pozzetto corrispondente della piastra PL PCR.
10. Eliminare la piastra BIND2 MIDI vuota.
11. Applicare il sigillo adesivo alla piastra PL PCR.
12. Riportare l'SPB e l'RSB nel luogo deputato alla conservazione.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se è necessario fermarsi, centrifugare la piastra PL PCR a 280 × g per un minuto e conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 30 giorni.

Preparazione del protocollo

Questa preparazione è necessaria per eseguire i passaggi del protocollo che precedono il successivo punto di arresto sicuro.

1. Rimuovere le provette di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 28 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20031121) in aggiunta a TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20140115)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
LNA1	Tra -25 °C e -15 °C	Scongela a temperatura ambiente.	Normalizzazione delle librerie
EE2	Tra -25 °C e -15 °C	Scongela a temperatura ambiente.	Normalizzazione delle librerie

Tabella 29 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20031123) in aggiunta a TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20140116)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
LNB1	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente per 30 minuti.	Normalizzazione delle librerie
HP3	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Normalizzazione delle librerie Preparazione per il sequenziamento
LNW1	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Normalizzazione delle librerie
LNS1	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Normalizzazione delle librerie

2. Se si prosegue lo stesso giorno con il passaggio [Preparazione per il sequenziamento alla pagina 66](#), seguire le istruzioni di scongelamento nella sezione Preparazione del protocollo.

Normalizzazione delle librerie

Questo processo utilizza l'LNB1 più additivi (LNA1) per normalizzare la quantità di ciascuna libreria così da garantire una rappresentazione uniforme della libreria nelle librerie raggruppate. Le microsfere vengono lavate due volte con l'LNW1. Le librerie vengono eluite con una miscela di eluzione EE2 + HP3 preparata al momento e

neutralizzate con l'LNS1.

Preparazione

1. Preparare i seguenti reagenti:
 - LNB1: assicurarsi che le microsfere siano rimaste a temperatura ambiente per 30 minuti.
 - LNA1: miscelare tramite vortex.
 - EE2: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - HP3: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - LNW1: miscelare tramite vortex. Mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
 - LNS1: miscelare tramite vortex. Mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
2. Miscelare tramite vortex l'LNB1 per un minuto per risospendere le microsfere. Invertire la provetta dell'LNB1 per assicurarsi che tutte le microsfere siano risospese.
3. Se si osserva la presenza di pellet, ripetere la miscelazione tramite vortex per 1 minuto.
4. Utilizzando una pipetta impostata su 800 µl, pipettare l'LNB1 su e giù 10 volte per garantire la risospensione.
5. Preparare al momento una miscela master di LNA1 + LNB1 e inserirla immediatamente in una provetta conica.



ATTENZIONE

Risospendere completamente il pellet di microsfere LNB1 sul fondo della provetta per evitare una densità dei cluster non coerente.

Tabella 30 Miscela master LNA1 + LNB1*

Componente miscela master	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
LNA1	610 µl	1.219 µl	1.829 µl	3.658 µl
LNB1	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

*Questa tabella include il volume in eccesso. Per i calcoli, consultare [Manipolazione dei reagenti alla pagina 32](#).

6. Miscelare tramite vortex la miscela master LNA1 + LNB1. Mettere da parte per la fase [Legame alla pagina 64](#).
7. Preparare al momento la miscela di eluizione EE2 + HP3 in una provetta per microcentrifuga.

Tabella 31 Miscela di eluizione EE2 + HP3 per la normalizzazione delle librerie*

Componente della miscela di eluizione	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
EE2	304 µl	608 µl	912 µl	1.824 µl
HP3	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

*Questa tabella include il volume in eccesso. Per i calcoli, consultare [Manipolazione dei reagenti alla pagina 32](#).

8. Miscelare tramite vortex la miscela di eluizione preparata al momento, quindi centrifugare brevemente. Mettere da parte per la fase [Eluizione alla pagina 65](#).
9. Se la piastra PL PCR è stata conservata, scongelarla a temperatura ambiente, quindi centrifugare a $280 \times g$ per un minuto. Pipettare per miscelare.
10. Apporre un'etichetta "BBN" (Normalizzazione basata su microsfere) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
11. Preparare il magnete.

Procedura

Legame

1. Miscelare tramite vortex la miscela master LNA1 + LNB1.
2. Aggiungere immediatamente 45 µl di miscela master LNA1 + LNB1 a ciascun pozzetto della libreria sulla piastra BBN MIDI.
3. Eliminare la miscela master LNA1 + LNB1 rimanente.
4. Aggiungere 20 µl di ciascuna libreria dalla piastra PL PCR al pozzetto corrispondente della piastra BBN MIDI.
5. Applicare il sigillo adesivo alla piastra BBN MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
6. Agitare a 1.800 giri/min per 30 minuti.
7. Applicare il sigillo adesivo alla piastra PL PCR e riportarla nel luogo deputato alla conservazione.
8. Posizionare la piastra BBN MIDI su un supporto magnetico per 2 minuti.
9. Tenere la piastra sul supporto magnetico. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.

Lavaggio

1. Lavare le microsfere come descritto di seguito.
 - a. Rimuovere la piastra BBN MIDI dal supporto magnetico.
 - b. Aggiungere 45 µl di LNW1 a ciascun pozzetto della libreria.
 - c. Applicare il sigillo adesivo alla piastra BBN MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
 - d. Agitare a 1.800 giri/min per cinque minuti.
 - e. Posizionare la piastra BBN MIDI su un supporto magnetico per 2 minuti.
 - f. Tenere la piastra sul supporto magnetico. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.
2. Lavare le microsfere una *seconda* volta.
3. Con una pipetta dalla punta sottile, rimuovere il surnatante residuo da ciascun pozzetto.

Eluizione

1. Rimuovere la piastra BBN MIDI dal supporto magnetico.
2. Miscelare tramite vortex la miscela di eluizione EE2 + HP3 preparata al momento, quindi centrifugare brevemente.
3. Aggiungere 32 µl di soluzione EE2 + HP3 a ciascun pozzetto della libreria della piastra BBN MIDI.
4. Eliminare la miscela di eluizione rimanente.
5. Applicare il sigillo adesivo alla piastra BBN MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
6. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
7. Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
8. Apporre un'etichetta "NL" (Librerie normalizzate) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
9. Trasferire con attenzione 30 µl di eluato da ciascun pozzetto della libreria della piastra BBN MIDI al pozzetto corrispondente della piastra NL PCR.



ATTENZIONE

Se le microsfere vengono aspirate nelle punte, erogarle nuovamente sulla piastra posta sul supporto magnetico e attendere che il liquido diventi chiaro (circa due minuti), prima di passare alla fase successiva della procedura.

10. Eliminare la piastra BBN MIDI vuota.
11. Miscelare l'LNS1 tramite vortex.
12. Aggiungere 30 µl di LNS1 a ciascun pozzetto della libreria nella nuova piastra NL PCR.
13. Pipettare cinque volte per miscelare.
14. Applicare il sigillo adesivo alla piastra NL PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
15. Riporre LNB1, LNA1, EE2, LNW1 e LNS1 nel luogo deputato alla conservazione.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se è necessario fermarsi, centrifugare la piastra NL PCR a 280 × g per 1 minuto e conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 32 giorni.

Preparazione del protocollo

Questa preparazione è necessaria per eseguire i passaggi del protocollo che precedono il sequenziamento.

Avviare la preparazione dei materiali di consumo per il sequenziamento del kit di reagenti NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 cicli) (n. codice 20028871) almeno un'ora prima dell'uso.

1. Rimuovere il tampone di diluizione della libreria (HT1) da -25 °C a -15 °C. Scongellare a temperatura ambiente. Dopo lo scongelamento, mantenere refrigerato.

2. Seguire le istruzioni di preparazione in *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 1000000009513)* per gli altri materiali di consumo nel kit.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicli)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cicli)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cicli)
3. Rimuovere le provette di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20031121)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
Campione di controllo PhiX	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente. Dopo lo scongelamento, mantenere refrigerato.	Preparazione per il sequenziamento

Tabella 33 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20031123) in aggiunta a TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20140116)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
HP3	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Preparazione per il sequenziamento
RSB (etichetta rosa)	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Preparazione per il sequenziamento

Preparazione per il sequenziamento

Ogni sessione di sequenziamento del DNA deve includere un controllo positivo e un NTC. L'NTC viene sequenziato ripetutamente secondo necessità in modo che ogni sessione contenga un NTC. Ogni sessione include un controllo positivo distinto.

Preparazione

1. Esaminare le linee guida per [Numero delle librerie e selezione degli indici alla pagina 33](#).
2. Apporre un'etichetta "dHP3" (HP3 diluito) a una provetta per microcentrifuga.
3. Apporre un'etichetta "dPhiX" (PhiX diluito) a una provetta per microcentrifuga.
4. Preriscaldare un blocco termico a 96 °C per provette da microcentrifuga.
5. Preparare un portaghiaccio o prodotto equivalente.

Diluizione e denaturazione del campione di controllo PhiX

1. Miscelare l'HP3 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
2. Combinare i volumi seguenti nella provetta per microcentrifuga del dHP3:
 - 10 µl HP3
 - 190 µl di acqua priva di DNasi/RNasi
3. Miscelare il dHP3 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
4. Invertire o miscelare tramite vortex l'RSB.
5. Miscelare il campione di controllo PhiX tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
6. Combinare i volumi seguenti nella provetta per microcentrifuga del dPhiX:
 - 8 µl di RSB
 - 2 µl di campione di controllo PhiX
7. Aggiungere 10 µl di dHP3 alla provetta del dPhiX.
8. Eliminare la provetta del dHP3.
9. Miscelare la provetta dPhiX tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
10. Incubare il dPhiX a temperatura ambiente per cinque minuti per denaturare.
11. Miscelare l'HT1 tramite vortex.
12. Aggiungere immediatamente 980 µl di HT1 preraffreddato al dPhiX.
13. Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
14. Conservare il dPhiX al freddo fino all'utilizzo nella preparazione della seconda diluizione.
La concentrazione finale è 20 pM dPhiX.
15. Riportare PhiX, HP3 e RSB nel luogo deputato alla conservazione.

Raggruppamento in pool e denaturazione delle librerie

1. Se la piastra NL PCR è stata conservata, scongelarla a temperatura ambiente, quindi centrifugare la piastra a 280 × g per un minuto.
2. Usando una pipetta multicanale impostata su 30 µl, miscelare delicatamente le librerie nella piastra NL PCR per cinque volte.
Usare punte nuove per ogni libreria.



ATTENZIONE

Per ottenere prestazioni ottimali, assicurarsi di miscelare bene le librerie.

3. Apporre un'etichetta "PDL" (Librerie di DNA raggruppate) a una provetta da microcentrifuga.
4. Apporre un'etichetta "PHL" (Librerie di HRD raggruppate) su una provetta da microcentrifuga.
5. Trasferire 10 µl di ciascuna libreria di DNA arricchito con OPD2 normalizzato dalla piastra NL alla provetta PDL.

Non raggruppare due librerie con lo stesso index primer.

6. Trasferire 10 µl di ciascuna libreria di DNA HRD arricchito con OPD3normalizzato dalla piastra NL alla provetta PHL.

Non raggruppare due librerie con lo stesso index primer.

7. Applicare il sigillo adesivo alla piastra NL PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
8. Miscelare tramite vortex le provette PDL e PHL.
9. Centrifugare brevemente le provette PDL e PHL.
10. Incubare le provette PDL e PHL in un blocco termico a 96 °C per 2 minuti.
11. Posizionare le provette PDL e PHL in ghiaccio per 5 minuti.
12. Miscelare tramite vortex le provette PDL e PHL, quindi centrifugare brevemente.
13. Riportare le provette PDL e PHL in ghiaccio.

Preparazione della prima diluizione

1. Apporre un'etichetta "DIL1" (Diluizione 1) a una provetta per microcentrifuga.
2. Trasferire 20 µl del PDL nella provetta DIL1 vuota.
3. Eliminare la provetta del PDL.
4. Aggiungere 5 µl di PHL a DIL1.
5. Aggiungere 475 µl dell'HT1 preraffreddato alla provetta DIL1 (diluizione 1:20).
6. Miscelare tramite vortex la provetta del DIL1, quindi centrifugare brevemente.
7. Eliminare la provetta di PHL.
8. **[Risoluzione dei problemi]** Dopo il sequenziamento, se si osservano errori di controllo qualità delle librerie a livello di sessione o sistemici associati alla normalizzazione basata su microsfere, passare a [Flusso di lavoro per la risoluzione dei problemi: preparazione della seconda diluizione regolata alla pagina 69](#).

Preparazione della seconda diluizione

1. Apporre un'etichetta "DIL2" (Diluizione 2) a una provetta per microcentrifuga da 2,0 ml.
2. Trasferire 40 µl di DIL1 nella provetta del DIL2 vuota.
3. Eliminare la provetta del DIL1.
4. Aggiungere 1.660 µl di HT1 preraffreddato alla provetta del DIL2 (diluizione 1:850).
5. Miscelare tramite vortex un preparato di dPhiX 20 pM, quindi centrifugare brevemente.
6. Aggiungere 2,5 µl di preparato dPhiX 20 pM alla provetta del DIL2.
7. Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
8. Caricare 1.300 µl di DIL2 nella NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicli) scongelata.
Consultare *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 1000000009513)* per ulteriori informazioni.

9. Eliminare la provetta del DIL2.
10. Centrifugare la piastra NL PCR a 280 × g per un minuto e conservare a temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 32 giorni.
11. Passare al sequenziamento.
Consultare *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 1000000009513)* per ulteriori informazioni.

Flusso di lavoro per la risoluzione dei problemi: preparazione della seconda diluizione regolata

Utilizzare questo flusso di lavoro per la risoluzione dei problemi quando, dopo il sequenziamento, si osservano errori di controllo qualità delle librerie a livello di sessione o sistemici associati alla normalizzazione basata su microsfere (consultare [Risoluzione dei problemi alla pagina 74](#) per maggiori informazioni). Le densità dei cluster al di fuori dell'intervallo di 170-220 K/mm² non devono essere regolate a meno che non siano associate a un errore di controllo qualità. Dopo aver completato la fase *Preparazione della prima diluizione*, preparare una seconda diluizione utilizzando i volumi DIL1 e HT1 regolati.

NOTA La seconda diluizione regolata viene applicata in base alla preparazione di ciascuna libreria. Dopo che la densità di cluster alta o bassa provoca una sessione di sequenziamento non valida o un QC di libreria non valido, le sessioni successive generate dalla preparazione delle stesse librerie possono essere regolate utilizzando lo stesso valore di densità di cluster. Le sessioni generate dalla preparazione di nuove librerie seguono il flusso di lavoro standard.

1. Usare la [Tabella 34](#) per trovare l'intervallo di densità del cluster (K/mm²) che include il valore osservato nella sessione di sequenziamento. Annotare il volume regolato corrispondente di DIL1 (µl) e HT1 (µl). Il volume del reagente combinato è sempre di 1.700 µl, corrispondente al volume di diluizione nominale.

Tabella 34 Regolazioni del volume in base alla densità del cluster

Intervallo densità cluster (K/mm ²)	Volume DIL1 (µl)	Volume HT1 (µl)
≤ 50	199	1501
51-70	169	1531
71-90	123	1577
91-110	95	1605
111-130	76	1624
131-150	63	1637
151-169	53	1.647
170-220	40	1660
221-240	31	1669

Intervallo densità cluster (K/mm ²)	Volume DIL1 (µl)	Volume HT1 (µl)
241-260	28	1672
261-280	25	1675
281-300	22	1678
≥ 300	21	1679

2. Apporre un'etichetta di risoluzione problemi diluizione 2 "TDIL2" (Troubleshooting Dilution 2) su una provetta per microcentrifuga da 2,0 ml.
3. Trasferire il volume di DIL1 dalla [Tabella 34](#) alla provetta TDIL2 vuota.
4. Eliminare la provetta DIL1.
5. Aggiungere il volume di HT1 preraffreddato dalla [Tabella 34](#) alla provetta TDIL2.
6. Miscelare tramite vortex un preparato di dPhiX 20 pM, quindi centrifugare brevemente.
7. Aggiungere 2,5 µl di preparato dPhiX 20 pM alla provetta TDIL2.
8. Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
9. Caricare 1.300 µl di TDIL2 nella NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicli) scongelata. Consultare *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 1000000009513)* per ulteriori informazioni.
10. Eliminare la provetta TDIL2.
11. Centrifugare la piastra NL PCR a 280 × g per un minuto, quindi conservarla a temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 32 giorni.
12. Passare al sequenziamento.
Consultare *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 1000000009513)* per ulteriori informazioni.

Interpretazione dei risultati

Per ogni singolo campione i risultati di sequenziamento del saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) vengono riportati in un report in formato PDF e in un report in formato JSON. A livello di campione viene generato anche un Low Depth Report (Report della profondità bassa) (`LowDepthReport.tsv`).

A livello della sessione vengono generati i seguenti file di output:

- `ControlOutput.tsv`
- `MetricsOutput.tsv`

Solo le varianti che superano il controllo qualità vengono riportate nei report in formato PDF e JSON.

Per informazioni dettagliate sull'analisi, consultare *Guida al flusso di lavoro del modulo di analisi di Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) (documento n. 200080937)*.

Risultati della diagnostica di accompagnamento

Per l'uso previsto di CDx, è possibile ottenere uno dei tre possibili risultati:

- **Positivo:** si rileva una variante o un biomarcatore (CDx).
- **Non rilevato:** nessuna variante o biomarcatore associato all'uso previsto dal CDx viene rilevato nel campione. Il tipo di cancro selezionato per il campione è appropriato per il CDx.
- **Nessun risultato:** la determinazione dello stato di una variante o di un biomarcatore non è possibile per uno o più dei seguenti motivi:
 - La sessione di sequenziamento non ha superato le specifiche del controllo qualità.
 - La libreria non ha superato le specifiche richieste del controllo qualità. Per le categorie di controllo qualità che hanno superato i test, non sono state rilevate varianti diagnostiche o biomarcatori correlati.
 - La libreria non ha superato le specifiche richieste degli NTC e dei controlli positivi.

Tutti i risultati CDx sono riportati nella sezione Companion Diagnostic Results (Risultati diagnostica di accompagnamento) del report JSON. Solo i risultati positivi sono elencati nella sezione Companion Diagnostic Results (Risultati diagnostica di accompagnamento) del report PDF.

Controllo qualità

La sessione di sequenziamento, la libreria e la validità del controllo sono determinate automaticamente e riportate dal Modulo di analisi TSO Comprehensive (EU, DRAGEN). Consultare [Tabella 35](#) e [Tabella 36](#) per le metriche e le specifiche QC applicate per la sessione di sequenziamento, la libreria e i controlli. Se il controllo positivo o l'NTC non soddisfano le specifiche, il software invalida automaticamente i campioni dei pazienti in base ai risultati dei campioni di controllo. Per informazioni dettagliate sull'analisi, consultare *Guida al flusso di lavoro del modulo di analisi di Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) (documento n. 200080937)*. Il report di TSO Comprehensive HRD (DRAGEN), disponibile nei formati PDF e JSON, riepiloga i risultati del controllo qualità. I report si trovano nella cartella dell'analisi. Consultare *Guida al flusso di lavoro del modulo di analisi di Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) (documento n. 200080937)* per la posizione della cartella di analisi (contiene i report PDF e JSON) e della cartella della sessione.

Le sessioni di sequenziamento e le librerie non valide devono essere ripetute. Per maggiori informazioni sulla ripetizione di sessioni di sequenziamento o sull'analisi di librerie, consultare [Risoluzione dei problemi alla pagina 74](#). Eseguire ulteriori misure di controllo qualità in base al sistema di gestione della qualità del laboratorio e in conformità alle normative locali, statali e/o federali o ai requisiti di accreditamento.

Per informazioni sulla quantificazione dell'acido nucleico e sui requisiti minimi del materiale di input, consultare [Estrazione, quantificazione e conservazione dell'acido nucleico alla pagina 24](#).

Tabella 35 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Metriche di controllo qualità dei risultati del report

Tipo di output	Metrica	Specifica	Descrizione	Impatto del mancato rispetto delle specifiche*
Sessione di sequenziamento	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	La percentuale di letture che attraversano il filtro (PF).	Esecuzione di sequenziamento invalidata. Non sono stati riportati risultati per nessun campione della sessione.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	La percentuale media delle identificazioni delle basi con punteggio qualitativo di Q30 o superiore per Read 1 (Lettura 1).	
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	La percentuale media delle identificazioni delle basi con punteggio qualitativo di Q30 o superiore per Read 2 (Lettura 2).	

Tipo di output	Metrica	Specifica	Descrizione	Impatto del mancato rispetto delle specifiche*
Librerie di DNA	CONTAMINATION_SCORE	≤ 1.457	Il punteggio della contaminazione basato sulla distribuzione della frequenza allelica delle varianti (VAF) di SNP.	Nessun risultato di DNA riportato.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	La lunghezza mediana dei frammenti nel campione.	Nessun risultato di varianti piccole di DNA BRCA riportato.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (conteggio)	≥ 150	La copertura mediana del frammento dell'esone su tutte le basi degli esoni.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	La percentuale di basi esoniche con copertura dei frammenti di 50X.	
	PCT_CHIMERIC_READS (%)	≤ 8	Percentuale di letture chimeriche.	Nessun risultato di grandi riarrangiamenti BRCA riportato.
	GENE_SCALED_MAD (conteggio)	$0 \leq x \leq 0,134$	La mediana delle deviazioni assolute dalla mediana del conteggio normalizzato di ogni regione CNV target.	
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (conteggio)	$\geq 1,0$	Il conteggio raggruppato mediano non elaborato per la CNV target.	
	PCT_TARGET_HRD_50X (%)	$\geq 50,0$	La percentuale di sonde HRD con copertura dei frammenti di 50X.	Nessun risultato GIS riportato.
	EXCESSIVE_TF (conteggio)	≤ 0	Metrica della modalità di errore che indica se la frazione tumorale è eccessiva e se i segnali tumorali e normali non possono più essere differenziati per il calcolo del GIS.	

* Per i risultati corretti viene mostrato il valore PASS (SUPERATO).

Tabella 36 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Metriche di controllo dei risultati del report

Tipo di output	Metrica	Specifica	Impatto del mancato rispetto delle specifiche*
DNA Positive Control (Controllo positivo DNA)	Sensibilità delle varianti piccole di DNA	Rilevate 51 delle 54 varianti specificate	Il software invalida automaticamente i campioni dei pazienti sulla base dei risultati dei controlli. Nessun risultato di varianti piccole di DNA BRCA riportato.
	Sensibilità dell'amplificazione genica	Rilevate 3 delle 3 varianti specificate	Il software invalida automaticamente i campioni dei pazienti sulla base dei risultati dei controlli. Nessun risultato di grandi riarrangiamenti BRCA riportato.
	PCT_TARGET_HRD_50X (%)	≥ 50	Il software invalida automaticamente i campioni dei pazienti sulla base dei risultati dei controlli. Nessun risultato GIS riportato.
DNA No-Template Control (Controllo senza template di DNA)	MEDIAN_EXON_COVERAGE	≤ 8	Il software invalida automaticamente i campioni dei pazienti sulla base dei risultati dei controlli. Non sono stati riportati risultati di varianti piccole di DNA BRCA e di grandi riarrangiamenti di BRCA.
	MEDIAN_TARGET_COVERAGE	≤ 2	Il software invalida automaticamente i campioni dei pazienti sulla base dei risultati dei controlli. Nessun risultato GIS riportato.

* Per i risultati corretti viene mostrato il valore PASS (SUPERATO).

Risoluzione dei problemi

Per risolvere i problemi nel flusso di lavoro, utilizzare la [Tabella 37](#). Se una sessione di sequenziamento o la preparazione delle librerie per un campione non riuscisse per due volte, potrebbe essere necessaria un'ulteriore operazione di risoluzione dei problemi. Contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

Prima di intraprendere le azioni di risoluzione dei problemi raccomandate, considerare le due categorie generali di cause per le librerie che non superano le specifiche del controllo qualità (QC). Quando le librerie di DNA non superano il QC, la causa di base è generalmente *specificata per il campione o per il pozzetto o sistemica* in relazione al flusso di lavoro.

Gli errori specifici del campione o del pozzetto possono derivare da errori di manipolazione o dalla qualità intrinseca del campione. Gli errori sistemici possono derivare dall'uso, dall'apparecchiatura, dai reagenti o dalla manipolazione dei reagenti e possono interessare più librerie. Sebbene gli errori sistemici siano più probabili quando tutte le librerie non superano il QC, la variabilità nella qualità dei campioni può causare errori sistemici che interessano solo un sottoinsieme di librerie o una singola libreria.

Analizzare le seguenti metriche per identificare la probabile fonte del risultato non valido.

- Ispezionare le letture PF totali (metrica espansa) per ciascuna libreria da `MetricsOutput.tsv`. Valori simili indicano un problema sistemico, mentre letture di PF totali basse per uno o pochi campioni, inclusi i campioni che non superano il controllo qualità della libreria, suggeriscono un problema di campione o pozzetto.
- Ispezionare le letture PF totali per il controllo positivo del DNA in `<run folder>/<analysis folder>/Logs_Intermediates/DnaQCMetrics/<control ID>/<control ID-DNA.aligned.metrics.json>` e confrontare la metrica con i valori storici. Una riduzione di questa metrica per un controllo positivo potrebbe essere indicativa di un problema sistemico.

Se una sessione di sequenziamento non supera le specifiche di controllo qualità della sessione, la causa è un errore sistemico.

Tabella 37 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Risoluzione dei problemi

Osservazione	Possibile causa	Intervento raccomandato
La sessione di sequenziamento non supera le specifiche del controllo qualità.	• Errore di raggruppamento • Errore diluizione • Problemi con la preparazione dei materiali di consumo di sequenziamento (ad esempio, non adeguatamente scongelati, condensa/detriti sulla cella a flusso)	Risequenziare le librerie dalla piastra NL PCR (Librerie normalizzate). Consultare Preparazione per il sequenziamento alla pagina 66 .

Osservazione	Possibile causa	Intervento raccomandato
	Normalizzazione basata su microsfere: elevata densità di cluster	Se si sospetta un errore elencato, correggere il problema e sequenziare nuovamente le librerie dalla piastra PCR delle librerie normalizzate (NL). Consultare Preparazione per il sequenziamento alla pagina 66. Se non si sospetta nessuno degli altri errori elencati, la concentrazione di microsfere dalla provetta di reagenti LNB1 potrebbe aver causato un'elevata densità di cluster. Ciò potrebbe essere dovuto a una miscelazione insufficiente delle microsfere. Individuare il valore della densità di cluster da <code>RunCompletionStatus.xml</code> nella cartella della sessione. L'intervallo di densità ottimale del cluster è 170-220 K/mm², ma valori più elevati possono comunque produrre sessioni che superano le specifiche QC. Se la densità di cluster è superiore all'intervallo ottimale e la sessione di sequenziamento non ha superato le specifiche QC, le librerie della piastra PCR delle librerie normalizzate (NL) possono essere risequenziate e regolate alla seconda diluizione. Ripetere Preparazione per il sequenziamento alla pagina 66 e seguire le istruzioni per la risoluzione dei problemi.

Osservazione	Possibile causa	Intervento raccomandato
Errore nella generazione di report o errore generale dello strumento (errore di rete, errori di caricamento/scarico dei reagenti, ecc.)	Problema del software o dello strumento.	Consultare <i>Guida al flusso di lavoro del modulo di analisi di Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)</i> (documento n. 200080937) per assistenza nella generazione di report. Per ricevere ulteriore assistenza, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
La libreria di DNA non supera le specifiche del controllo qualità.	I requisiti per l'input del campione non sono stati soddisfatti.	Assicurarsi che l'input del campione sia appropriato e ripetere la preparazione delle librerie dal passaggio "Frammentazione del gDNA". Consultare Requisiti dei campioni alla pagina 24 e Estrazione, quantificazione e conservazione dell'acido nucleico alla pagina 24 .
	Errore di utilizzo o di apparecchiatura nel flusso di lavoro del saggio	Ripetere la preparazione delle librerie da uno dei seguenti passaggi a seconda del punto in cui si è verificato il sospetto errore di utilizzo o di apparecchiatura. Se si ignorasse il punto o se si verificano errori di altro tipo, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina per risolvere i problemi della sessione. • Rissequenziare le librerie dalla piastra NL PCR (Librerie normalizzate). Consultare Preparazione per il sequenziamento alla pagina 66. • Avviare la preparazione delle librerie dall'inizio del flusso di lavoro. Consultare Frammentazione del gDNA alla pagina 40.

Osservazione	Possibile causa	Intervento raccomandato
La libreria di DNA non supera le specifiche del controllo qualità (segue).	I criteri CONTAMINATION_SCORE non sono stati soddisfatti.	Rivedere le avvertenze e le precauzioni per informazioni su come evitare la contaminazione incrociata. Rivedere il layout della piastra e l'indicizzazione della libreria per assicurarsi che i campioni dello stesso indice non siano stati sequenziati insieme. Per i campioni interessati, avviare la preparazione delle librerie dall'inizio del flusso di lavoro. Fare riferimento a Frammentazione del gDNA alla pagina 40. La contaminazione potrebbe essersi verificata durante l'estrazione del campione. Potrebbe essere necessario ripetere l'estrazione per assicurarsi che il campione sia privo di contaminazione.

Osservazione	Possibile causa	Intervento raccomandato
	Il campione potrebbe essere eccessivamente frammentato o presentare danni all'acido nucleico che incidono sulla capacità di generare sufficienti librerie univoche.	Rivedere Impostazioni di configurazione del sonificatore a ultrasuoni per la frammentazione del DNA alla pagina 20 le impostazioni del produttore del sonificatore a ultrasuoni relative all'uso e al funzionamento (compreso il livello dell'acqua e il tipo di provetta). Assicurarsi che l'input di campione nel saggio sia appropriato. Consultare Requisiti dei campioni alla pagina 24 e Estrazione, quantificazione e conservazione dell'acido nucleico alla pagina 24. Se il campione fosse eccessivamente frammentato o danneggiato, potrebbe essere necessaria una nuova estrazione del campione e/o la ripetizione della fase "Frammentazione del gDNA".
	• Errore di raggruppamento. • Errore diluizione. • Denaturazione termica incompleta di PDL/PHL.	Escludere le cause correlate al DNA elencate sopra (ad es., input del campione, qualità del campione, apparecchiature). Risequenziare le librerie dalla piastra NL PCR (Librerie normalizzate). Consultare Preparazione per il sequenziamento alla pagina 66.

Osservazione	Possibile causa	Intervento raccomandato
La libreria di DNA non supera le specifiche del controllo qualità (segue).	Normalizzazione basata su microsfere (elevata densità di cluster).	Se non si sospetta nessuna delle altre possibili cause di mancato superamento del controllo qualità delle librerie, la concentrazione di microsfere dalla provetta di reagenti LNB1 potrebbe aver causato una bassa densità di cluster in conseguenza di una miscelazione insufficiente. Individuare e registrare il valore della densità di cluster da <code>RunCompletionStatus.xml</code> nella cartella della sessione. Se la densità di cluster è inferiore a 170 K/mm ² e si sospetta una normalizzazione sistemica basata su microsfere (incluse le evidenze ottenute dalle letture totali di PF per i controlli positivi), risequenziare le librerie dalla piastra PCR delle librerie normalizzate (NL) e seguire le istruzioni per una seconda diluizione regolata. Consultare Preparazione per il sequenziamento alla pagina 66 e Flusso di lavoro per la risoluzione dei problemi: preparazione della seconda diluizione regolata alla pagina 69 .
	Errore nel flusso di lavoro di preparazione delle librerie durante o prima della fase di indicizzazione PCR	Avviare la preparazione delle librerie dall'inizio del flusso di lavoro. Consultare Frammentazione del gDNA alla pagina 40 .

Osservazione	Possibile causa	Intervento raccomandato
	• Uso non corretto delle sonde di arricchimento. • Errore nel flusso di lavoro di preparazione della libreria durante o dopo la prima fase di ibridazione.	Un errore sistemico nel pool di sonde (ad esempio, lo scambio dei pool di sonde) potrebbe comportare un numero totale di letture filtrate che superano il filtro, ma una copertura mediana degli esoni che non supera il controllo qualità. Avviare la preparazione delle librerie dall'inizio del flusso di lavoro. Consultare Frammentazione del gDNA alla pagina 40.
Mancata esecuzione del controllo positivo.	I requisiti di input del campione per il controllo positivo non sono stati soddisfatti Errore di utilizzo o di apparecchiatura nel flusso di lavoro del saggio	Assicurarsi che l'input del saggio sia appropriato. Rivedere il layout della piastra e assicurarsi che i reagenti appropriati (sonde, indici) si trovino nei pozzetti corretti. Assicurarsi che il campione di controllo positivo sia conservato secondo l'etichetta. Per tutti i campioni che condividono il controllo positivo, ripetere la preparazione delle librerie da uno dei passaggi seguenti, a seconda del punto in cui si è verificato il sospetto errore di utilizzo o di apparecchiatura. Se si ignorasse il punto o se si verificano errori di altro tipo, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina per risolvere i problemi della sessione. • Rissequenziare le librerie dalla piastra NL PCR (Librerie normalizzate). Consultare Preparazione per il sequenziamento alla pagina 66. • Avviare la preparazione delle librerie dall'inizio del flusso di lavoro. Fare riferimento a Frammentazione del gDNA alla pagina 40.

Osservazione	Possibile causa	Intervento raccomandato
NTC non riuscito.	Si è verificata una contaminazione incrociata o una contaminazione dell'area di lavoro.	Consultare la sezione Avvertenze e precauzioni per informazioni sulla decontaminazione delle aree di lavoro e per evitare la contaminazione incrociata. Rivedere il layout della piastra e l'indicizzazione della libreria per assicurarsi che i campioni dello stesso indice non siano stati sequenziati insieme. Ripetere la preparazione delle librerie dall'inizio del flusso di lavoro per tutte le librerie che condividono il controllo senza template.
	Indicizzazione errata della libreria.	
I controlli positivi e/o negativi nella sessione di sequenziamento sono stati analizzati come campioni non di controllo.	Assegnazione errata del tipo di campione durante la configurazione della sessione di sequenziamento.	Ripetere l'analisi con i controlli correttamente identificati come indicato nella Guida al flusso di lavoro del modulo di analisi (consultare <i>Guida al flusso di lavoro del modulo di analisi di Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)</i> (documento n. 200080937)).

Caratteristiche delle prestazioni

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) è un saggio che consente la valutazione di HRD utilizzando il DNA estratto da campioni di tessuto tumorale FFPE provenienti da pazienti affette da carcinoma ovarico. Utilizza due pannelli NGS. Un pannello viene utilizzato per il rilevamento di alterazioni deleterie e sospette nei geni BRCA1 e BRCA2, incluse varianti piccole di DNA e grandi riarrangiamenti. Un secondo pannello NGS serve per misurare l'instabilità genomica riportata come GIS. BRCA-positivo è definito come il rilevamento di un'alterazione deleteria o sospetta deleteria in geni BRCA1 o BRCA2. GIS-positivo è definito come GIS $\geq$ 42. HRD-positivo è definito come BRCA-positivo e/o GIS-positivo.

Negli studi sono stati inclusi campioni FFPE con varianti CDx positive specifiche.

Gli intervalli di confidenza (IC) bilaterali al 95% sono calcolati utilizzando il metodo del punteggio di Wilson se non diversamente specificato.

La [Tabella 38](#) fornisce le definizioni delle metriche calcolate in diversi studi.

Tabella 38 Definizioni delle metriche

Termine	Definizione
Percentuale di concordanza positiva (PPA)	La percentuale di risultati positivi del metodo di confronto in cui TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) è positivo.
Percentuale di concordanza negativa (NPA)	La percentuale di risultati negativi del metodo di confronto in cui TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) è negativo.
Percentuale identificazioni positive (Percent Positive Call, PPC)	La percentuale di osservazioni positive per un target tra le osservazioni previste come positive per il target.
Percentuale identificazioni negative (Percent Negative Call, PNC)	La percentuale di osservazioni negative per un target tra le osservazioni previste come negative per il target.
n/N	Il numero di osservazioni positive o negative (n) diviso per le osservazioni totali (N) per calcolare rispettivamente PPC o PNC. I valori di n e N possono essere a livelli diversi (ad es. variante o gene) o combinati in un gruppo (ad es. SNV).
Deviazione standard (DS)	Una misura della quantità di variazione dei valori di una variabile circa la sua media.

Termine	Definizione
Percentuale coefficiente di variazione (%CV)	Deviazione standard divisa per la media in percentuale.

Accuratezza

L'accuratezza del saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) per il rilevamento di HRD in pazienti con carcinoma ovarico è stata dimostrata valutando la concordanza dello stato HRD, dello stato GIS e dei risultati dello stato BRCA tra il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) e un saggio di confronto convalidato basato su NGS. L'accuratezza è stata stimata rispetto al metodo ortogonale; sono stati calcolati PPA, NPA e l'IC bilaterale al 95% associato al punteggio di Wilson.

Sono stati analizzati 175 campioni di DNA estratti da tessuto di carcinoma ovarico FFPE con il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) e/o il metodo ortogonale. Un campione presentava risultati TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) non validi e un altro campione presentava risultati del saggio di confronto non validi. Il set di dati valutabile per lo stato GIS e HRD era di 173 campioni. Il set di dati valutabile per lo stato BRCA era di 169 a causa dell'esclusione di quattro campioni aggiuntivi con varianti BRCA al di fuori dell'intervallo di misurazione del saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Le analisi di concordanza basate sui risultati validi del test sono mostrate nella [Tabella 39](#), nella [Tabella 40](#) e nella [Tabella 41](#).

Tabella 39 Concordanza tra il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) e il metodo di confronto per il rilevamento dello stato HRD

		Risultato del metodo di confronto		
		HRD positivo	HRD negativo	Totale
Risultato del saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)	HRD positivo	97	6	103
	HRD negativo	6	64	70
	Totale	103	70	173
Statistiche di concordanza	PPA% (n/N; IC al 95%)	94,2% (97/103; 87,9%, 97,3%)		
	NPA% (n/N; IC al 95%)	91,4% (64/70; 82,5%, 96,0%)		

Tabella 40 Concordeza tra il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) e il metodo di confronto per il rilevamento dello stato GIS

		Risultato del metodo di confronto		
		GIS positivo	GIS negativo	Totale
Risultato del saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)	GIS positivo	95	3	98
	GIS negativo	6	69	75
	Totale	101	72	173
Statistiche di concordanza	PPA% (n/N; IC al 95%)	94,1% (95/101; 87,6%, 97,2%)		
	NPA% (n/N; IC al 95%)	95,8% (69/72; 88,5%, 98,6%)		

Tabella 41 Concordeza tra il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) e il metodo di confronto per il rilevamento dello stato BRCA

		Risultato del metodo di confronto		
		BRCA positivo	BRCA negativo	Totale
Risultato del saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)	BRCA positivo	40	8	48
	BRCA negativo	2	119	121
	Totale	42	127	169
Statistiche di concordanza	PPA% (n/N; IC al 95%)	95,2% (40/42; 84,2%, 98,7%)		
	NPA% (n/N; IC al 95%)	93,7% (119/127; 88,1%, 96,8%)		

Riproducibilità

La riproducibilità e la ripetibilità del saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) sono state valutate in tre centri di analisi esterni con due operatori per centro, due replicati intra-sessione, tre lotti e tre giorni non consecutivi. In ciascuno dei tre centri, due operatori hanno condotto in modo indipendente i test su strumenti NextSeq 550Dx separati. Il test è stato condotto con un pannello di riproducibilità di 27 membri contenente DNA estratto da campioni di tessuto ovarico FFPE con mutazioni BRCA1 e BRCA2 note e/o GIS.

Dei 27 membri del pannello, 16 sono stati selezionati come target per varianti piccole di DNA nei geni BRCA, tra cui: SNV, varianti in regioni omopolimeriche ≥ 5 bp, inserzioni e delezioni < 10 bp e inserzioni e delezioni ≥ 10 bp. Per il tipo di variante BRCA LR, sono stati utilizzati due membri del pannello per le varianti BRCA LR < 3 esoni e un elemento del pannello per le varianti BRCA LR ≥ 3 esoni. Per GIS, tre membri del pannello rappresentavano lo stato GIS alto (+), tre membri del pannello rappresentavano GIS (-), due membri del pannello rappresentavano GIS basso (+) e uno dei membri del pannello che rappresentavano già le varianti LR < 3 esoni rappresentava anche un membro GIS basso (+). In ogni centro, ciascun operatore ha testato i membri del pannello nel corso di tre giorni non consecutivi, generando sei osservazioni per ciascun target per ciascun membro del pannello. In tutti e tre i centri, sono state generate 36 osservazioni per ciascun membro del pannello (tre centri $\times$ due operatori/strumenti $\times$ tre giorni $\times$ due replicati intra-sessione).

Sono stati determinati PPC e PNC per i membri target del pannello. Le analisi sono state eseguite per stimare PPC e PNC (con IC al 95% associati) combinando i risultati dei sei operatori nei tre centri. Per ciascuna variante piccola di DNA target e variante LR, le osservazioni del saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) nei membri del pannello che si prevedeva fossero negativi per la variante target sono state combinate per calcolare PNC. Le osservazioni del saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) nei membri del pannello GIS (-) sono state combinate per calcolare PNC per i membri del pannello GIS (-).

Varianti piccole di DNA BRCA

I valori PPC per i membri del pannello delle varianti piccole di DNA BRCA sia di alto livello (2-3×C95) sia di basso livello (1-1,5×C95) erano tutti al 100% (Tabella 42). Anche i valori PNC per i membri del pannello delle varianti piccole di DNA BRCA erano tutti pari al 100% (Tabella 43).

Tabella 42 PPC per le varianti piccole di DNA BRCA target in base al livello di variante e alla classe di varianti

Livello variante	Classe variante	Variante target	VAF media	PPC (%) (n/N)	al 95%
Alto	SNV	BRCA1 p.(A1708E)	0.129	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 c.80+1G>A	0.121	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Varianti negli omopolimeri ≥ 5 bp	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	0.248	100 (34/34)	(89,8, 100)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	0.239	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Inserzione o delezione (< 10 bp)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	0,166	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	0.153	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Inserzione o delezione (≥ 10 bp)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	0.189	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	0.141	100 (33/33)	(89,6, 100)
	SNV	BRCA1 p.(A1708E)	0.087	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 c.80+1G>A	0.087	100 (36/36)	(90,4, 100)
Basso	Varianti negli omopolimeri ≥ 5 bp	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	0.147	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	0.142	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Inserzione o delezione (< 10 bp)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	0.121	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	0.122	100 (35/35)	(90,1, 100)
	Inserzione o delezione (≥ 10 bp)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	0.109	100 (35/35)	(90,1, 100)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	0,111	100 (36/36)	(90,4, 100)

Tabella 43 PNC per varianti piccole di DNA BRCA target per classe di variante

Classe variante	Variante target	PNC (%) (n/N)	al 95%
SNV	BRCA1 p.(A1708E)	100 (585/585)	(99,3, 100)
	BRCA1 c.80+1G>A	100 (557/557)	(99,3, 100)
Varianti negli omopolimeri ≥ 5 bp	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	100 (566/566)	(99,3, 100)
	BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	100 (492/492)	(99,2, 100)
Inserzione o delezione (< 10 bp)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	100 (627/627)	(99,4, 100)
	BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	100 (632/632)	(99,4, 100)
Inserzione o delezione (≥ 10 bp)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	100 (584/584)	(99,3, 100)
	BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	100 (634/634)	(99,4, 100)

La [Tabella 44](#) mostra l'analisi dei componenti della varianza per fonte di variazione per i livelli alti e bassi per ciascuna classe di varianti piccole di DNA BRCA. La VAF media tra le varianti piccole di DNA BRCA target di alto livello variava da 0,121 a 0,248 e le varianti piccole di DNA BRCA target di basso livello variavano da 0,087 a 0,147. La DS totale tra le varianti piccole di DNA BRCA target variava da 0,019 (CV 11,4%) a 0,041 (CV 28,7%) per le varianti piccole di DNA BRCA di alto livello e da 0,016 (CV 18,9%) a 0,043 (CV 30,1%) per le varianti piccole di DNA BRCA di basso livello.

Tabella 44 Analisi dei componenti di varianza di VAF per le varianti piccole di DNA BRCA target

Livello variante	Classe variante	Variante target	N.	VAF media	DS sede (%CV)	DS operatore/strumento (%CV)	DS giorno (%CV)	DS lotto (%CV)	DS ripetibilità (%CV)	DS totale (%CV)
Alto	SNV	BRCA1 p.(A1708E)	36	0.129	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,007 (5,5)	0,000 (0,0)	0,020 (15,4)	0,021 (16,3)
		BRCA1 c.80+1G>A	36	0.121	0,007 (5,5)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,023 (19,2)	0,024 (19,9)
	Varianti di omopolimeri ≥ 5 bp	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	34	0.248	0,000 (0,0)	0,011 (4,3)	0,008 (3,3)	0,000 (0,0)	0,025 (10,1)	0,029 (11,5)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	36	0.239	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,006 (2,5)	0,000 (0,0)	0,041 (17,0)	0,041 (17,1)
	Inserzione o delezione < 10 bp	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	36	0.166	0,006 (3,7)	0,005 (3,2)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (10,3)	0,019 (11,4)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	36	0.153	0,008 (5,1)	0,000 (0,0)	0,013 (8,5)	0,000 (0,0)	0,020 (12,9)	0,025 (16,3)
	Inserzione o delezione ≥ 10 bp	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	36	0.189	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,006 (3,3)	0,015 (8,0)	0,033 (17,5)	0,037 (19,6)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	33	0.141	0,000 (0,0)	0,013 (9,5)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,038 (27,1)	0,041 (28,7)

Livello variante	Classe variante	Variante target	N.	VAF media	DS sede (%CV)	DS operatore/strumento (%CV)	DS giorno (%CV)	DS lotto (%CV)	DS ripetibilità (%CV)	DS totale (%CV)
Basso	SNV	BRCA1 p.(A1708E)	36	0.087	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,003 (3,0)	0,000 (0,0)	0,016 (18,7)	0,016 (18,9)
		BRCA1 c.80+1G>A	36	0.087	0,003 (3,7)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,019 (22,0)	0,019 (22,3)
	Varianti di omopolimeri ≥ 5 bp	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	36	0.147	0,000 (0,0)	0,003 (2,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,021 (14,0)	0,021 (14,1)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	36	0.142	0,011 (8,0)	0,000 (0,0)	0,010 (7,2)	0,015 (10,7)	0,037 (26,0)	0,043 (30,1)
	Inserzione o delezione < 10 bp	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	36	0.121	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,004 (3,7)	0,017 (14,0)	0,017 (14,5)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	35	0.122	0,004 (3,4)	0,007 (5,6)	0,000 (0,0)	0,006 (5,0)	0,021 (16,9)	0,023 (18,8)
	Inserzione o delezione ≥ 10 bp	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	35	0.109	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,007 (6,5)	0,006 (5,5)	0,026 (24,3)	0,028 (25,8)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	36	0.111	0,000 (0,0)	0,006 (5,7)	0,000 (0,0)	0,006 (5,7)	0,029 (26,0)	0,030 (27,2)

Varianti di grandi riarrangiamenti in BRCA

I valori PPC per BRCA LR target erano 100% (29/29) per BRCA2 LR ≥ 3 esoni, 97,2% (35/36) per BRCA2 LR < 3 esoni e 94,3% (33/35) per BRCA1 LR < 3 esoni ([Tabella 45](#)). I valori PNC per BRCA LR target erano del 98,9% (630/637) per BRCA1 e del 100% (607/607) per BRCA2 ([Tabella 46](#)).

Tabella 45 PPC per BRCA LR target per classe di variante

Classe variante	Variante target	VAF media	PPC (%) (n/N)	IC al 95%*
LR ≥ 3 esoni	PERDITA BRCA2	0.448	100 (29/29)	(88,3, 100)
LR < 3 esoni	PERDITA BRCA2	0.602	97,2 (35/36)	(85,8, 99,5)
	PERDITA BRCA1	0.680	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)

Tabella 46 PNC per BRCA LR target

Variante target	PNC (%) (n/N)	IC al 95%*
PERDITA BRCA1	98,9 (630/637)	(97,7, 99,5)
PERDITA BRCA2	100 (607/607)	(99,4, 100)

La [Tabella 47](#) mostra l'analisi dei componenti di varianza per fonte di variazione per ciascuna classe BRCA LR. La VAF media per la variante LR ≥ 3 esoni era 0,448 con una DS totale di 0,026 (5,7% CV). La VAF media per le varianti LR < 3 esoni variava da 0,602 a 0,680 e la DS totale variava da 0,038 (6,3% CV) a 0,079 (11,6% CV).

Tabella 47 Analisi dei componenti di varianza di VAF in BRCA LR target

Classe variante	Variante target	N.	VAF media	DS centro (%CV)	Operatore /		DS giorno (%CV)	DS lotto (%CV)	Ripetibilità DS (%CV)	DS totale (%CV)
					Strumento	DS (%CV)				
LR ≥ 3 esoni	PERDITA BRCA2	29	0.448	0,000 (0,0)	0,005 (1,1)		0,013 (2,9)	0,000 (0,0)	0,022 (4,8)	0,026 (5,7)
LR < 3 esoni	PERDITA BRCA2	36	0.602	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)		0,015 (2,5)	0,000 (0,0)	0,035 (5,8)	0,038 (6,3)
	PERDITA BRCA1	35	0.680	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)		0,048 (7,1)	0,000 (0,0)	0,062 (9,2)	0,079 (11,6)

Punteggio di instabilità genomica (GIS, Genomic Instability Score)

I valori PPC erano del 100% per i membri del pannello GIS alto (+). I membri del pannello GIS basso (+) presentavano valori PPC compresi tra 94,4% e 100% (Tabella 48). I valori PNC erano del 100% su tutti i membri del pannello GIS (-) (Tabella 49).

Tabella 48 PPC per GIS in base allo stato GIS target e al membro del pannello

Stato GIS target	GIS target	GIS medio	PPC (%) (n/N)	IC al 95%*
GIS alto (+)	69.8	70.2	100 (36/36)	(90,4, 100)
	59.5	60.1	100 (36/36)	(90,4, 100)
	63.7	61.7	100 (36/36)	(90,4, 100)
GIS basso (+)	47.2	46.3	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	52.7	53.1	100 (36/36)	(90,4, 100)
	53.0	52.5	100 (36/36)	(90,4, 100)

Tabella 49 PNC per membri del pannello target GIS negativo

Stato GIS target	GIS target	GIS medio	PNC (%) (n/N)	IC al 95%*
GIS (-)	24.5	23.3	100 (36/36)	(90,4, 100)
	(19,2)	18,2	100 (36/36)	(90,4, 100)
	19.5	21.0	100 (36/36)	(90,4, 100)

La Tabella 50 mostra l'analisi delle componenti di varianza in base alla fonte di variazione per ciascun membro del pannello GIS alto (+), GIS basso (+) e GIS (-). Il GIS medio tra i membri del pannello GIS target variava da 60,1 a 70,2 per GIS alto (+), da 46,3 a 53,1 per GIS basso (+) e da 18,2 a 23,3 per GIS (-). La DS totale tra i membri del pannello GIS target variava da 2,5 (3,5% CV) a 3,2 (5,2% CV) per GIS alto (+), da 1,5 (2,9% CV) a 3,8 (7,2% CV) per GIS basso (+) e da 2,5 (11,7% CV) a 3,3 (14,1% CV) per i membri del pannello GIS (-).

Tabella 50 Analisi delle componenti di varianza di GIS nei membri del pannello target

Stato GIS target	GIS target	N.	GIS medio	DS centro (%CV)	Operatore /	DS giorno (%CV)	DS lotto (%CV)	Ripetibilità DS (%CV)	DS totale (%CV)
					Strumento DS (%CV)				
GIS alto (+)	69.8	36	70.2	0,0 (0,0)	1,2 (1,7)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	2,2 (3,1)	2,5 (3,5)
	59.5	36	60.1	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,0 (1,7)	0,0 (0,0)	2,7 (4,4)	2,8 (4,7)
	63.7	36	61.7	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,9 (1,5)	0,0 (0,0)	3,1 (5,0)	3,2 (5,2)
GIS basso (+)	47.2	36	46.3	0,0 (0,0)	1,7 (3,7)	0,0 (0,0)	0,7 (1,6)	2,8 (6,1)	3,4 (7,3)
	52.7	36	53.1	0,9 (1,7)	1,2 (2,3)	0,0 (0,0)	0,4 (0,8)	3,5 (6,5)	3,8 (7,2)
	53.0	36	52.5	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,5 (2,9)	1,5 (2,9)
GIS (-)	24.5	36	23.3	0,9 (3,7)	1,6 (6,9)	1,6 (7,0)	0,9 (3,7)	2,0 (8,7)	3,3 (14,1)
	(19,2)	36	18,2	0,7 (3,7)	0,0 (0,0)	0,6 (3,5)	0,1 (0,4)	2,4 (13,4)	2,6 (14,4)
	19.5	36	21.0	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,6 (3,0)	1,3 (6,3)	2,0 (9,4)	2,5 (11,7)

Limite del bianco

La percentuale di falsi positivi (sul totale dei negativi attesi) è stata valutata mediante test di replica del tessuto ovarico adiacente benigno FFPE. Si prevedeva che il tessuto fosse GIS negativo e non contenesse mutazioni deleterie o sospette di BRCA1 e BRCA2 (varianti piccole di DNA e LR). Sette campioni di DNA FFPE ovarico benigno sono stati analizzati in duplicato con due operatori nell'arco di tre giorni per ciascuno dei due lotti di reagenti in formato a 8 plex. Un sottoinsieme di campioni è stato ri-raggruppato in pool e risequenziato in formato a 3 plex per valutare i falsi positivi con diverse configurazioni multiplex supportate da questo dispositivo. In totale, sono risultate 168 osservazioni possibili. La percentuale di falsi positivi è stata calcolata a livello di posizione per le varianti piccole di DNA BRCA (circa 3 milioni di posizioni), a livello genico per BRCA LR e a livello di campione per GIS. La percentuale di falsi positivi per ciascun tipo di variante è mostrata nella [Tabella 51](#).

Tabella 51 Falsi positivi per tipo di variante

Tipo di variante	Falsi positivi*
Varianti piccole di DNA BRCA	0% (0/3.076.657)
BRCA LR	0% (0/384)
GIS	0% (0/192)

* I denominatori sono totali di sessioni a 8 e 3 plex.

Limite del rilevamento

Il limite di rilevamento (LoD, Limit of Detection) delle varianti piccole di DNA BRCA (SNV, inserzioni o delezioni ≥ 10 bp, inserzioni o delezioni < 10 bp, varianti in regioni omopolimeriche ≥ 5 bp), BRCA LR < 3 esoni e ≥ 3 esoni, e GIS sono stati determinati in campioni di DNA tumorale FFPE. Il LoD è il valore più basso dell'analita rilevabile in modo coerente (tasso di successo al 95% o errore di tipo II del 5%). Il LoD per GIS è stato definito come il contenuto tumorale più basso che raggiunge $\geq 95\%$ di rilevamento GIS e per le varianti piccole di DNA BRCA e

LR come frequenza allelica delle varianti (VAF, Variant Allele Frequency). I campioni di DNA FFPE per carcinoma ovarico sono stati utilizzati per le varianti piccole di DNA BRCA, GIS e BRCA LR ≥ 3 esoni. Per < 3 esoni di BRCA LR è stato utilizzato un campione di DNA FFPE per carcinoma mammario data la mancanza di disponibilità di tessuto FFPE per carcinoma ovarico. I campioni sono stati diluiti a più livelli di test, con 12 osservazioni per ciascun livello di test per ciascun lotto di reagenti per ciascuna variante, generate da più operatori in tre giorni non consecutivi utilizzando due lotti di reagenti. Come limite di rilevamento per la variante è stato preso il valore LoD più ampio sui due lotti di reagente ([Tabella 52](#)).

Tabella 52 Limite di rilevamento per le varianti piccole di DNA BRCA, BRCA LR, GIS

Tipo di variante	Classe variante	C95
Varianti piccole di DNA BRCA	SNV	0,05 VAF
	Inserzioni o delezioni ≥ 10 bp	0,06 VAF
	Inserzioni o delezioni < 10 bp	0,07 VAF
	Varianti nell'omopolimero regione ≥ 5 bp	0,07 VAF
Grandi riarrangiamenti di BRCA	LR < 3 esoni	0,61 VAF
	LR ≥ 3 esoni	0,46 VAF
GIS	GIS	33% di contenuto tumorale

Sostanze interferenti

L'impatto delle potenziali sostanze endogene ed esogene sulle prestazioni del saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) è stato valutato con la sostanza endogena (emoglobina) che è stata addizionata nei campioni durante il processo di estrazione dell'acido nucleico, nonché con le sostanze esogene (etanolo, proteinasi K, tampone di lavaggio, paraffina, xilene e index primer in eccesso) che sono state addizionate nell'acido nucleico purificato prima della preparazione delle librerie. Quattro replicati delle librerie di campioni sono stati generati da uno o più operatori. Per tutte le sostanze sono stati utilizzati 10 campioni FFPE di carcinoma ovarico per l'analisi di varianti piccole di DNA BRCA, BRCA LR e GIS. L'effetto della necrosi è stato valutato anche su un diverso set di tre campioni FFPE di carcinoma ovarico con un intervallo di tessuto necrotico (10%-20%). Per ogni campione di tessuto necrotico è stato incluso un controllo privo di necrosi sottoposto a macrodissezione. Quattro replicati di librerie di DNA e dei rispettivi controlli sono stati elaborati insieme. Per tutti gli interferenti, i replicati dei campioni per ciascuna sostanza sono stati confrontati con i rispettivi replicati di controllo. Emoglobina (4 mg/ml), etanolo (5%), proteinasi K (2 volte la concentrazione del metodo di estrazione rappresentativo), tampone di lavaggio (2,5%), paraffina (25% del tessuto digerito omogeneizzato), xilene (0,0001%), index primers (30% di eccesso) non interferiscono con il rilevamento di varianti piccole di DNA BRCA, BRCA LR e GIS. I livelli VAF di varianti piccole di DNA BRCA e GIS non sono stati influenzati dalla presenza di alcuno degli interferenti testati. La presenza di tessuto necrotico fino al 20% non ha interferito con le varianti piccole di DNA e GIS. Le BRCA LR non sono state valutate per la necrosi a causa della mancanza di disponibilità di un campione FFPE di carcinoma ovarico necrotico contenente una variante BRCA LR.

Guardband della titolazione dell'input di acido nucleico

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) richiede un input fisso di 40 ng di campione di DNA. Le prestazioni del saggio sono state valutate utilizzando nove campioni di DNA estratti dal tessuto FFPE ovarico per stabilire le tolleranze per la variazione dell'input di acido nucleico che potrebbe portare all'insuccesso del saggio o influire negativamente sull'output del saggio. Ciascun campione FFPE conteneva una o più varianti piccole di DNA BRCA, BRCA LR o GIS ed è stato analizzato a cinque livelli di input (20 ng, 30 ng, 40 ng [nominale], 60 ng e 100 ng) in triplicato. I risultati hanno dimostrato che il rilevamento delle varianti piccole di DNA BRCA, l'identificazione di BRCA LR e lo stato GIS non sono stati influenzati dalla differenza nella quantità di input.

I risultati hanno inoltre mostrato che gli input di acido nucleico due volte inferiori alla condizione nominale presentavano un numero maggiore di errori di controllo qualità che hanno portato a un minor numero di campioni valutati per l'identificazione delle varianti. A livello di input di 20 ng, è stato ottenuto un tasso di validità della libreria del 55,5% a causa di errori nella percentuale di copertura degli esoni a 50X (PCT_EXON_50X) e nella copertura mediana degli esoni (MEDIAN_EXON_COVERAGE). La VAF di varianti piccole di DNA BRCA e GIS non sono stati interessati a livello di input di 20 ng.

Contaminazione incrociata

Lo studio sulla contaminazione incrociata è stato condotto per valutare se nel saggio si riscontrano dei risultati falsi positivi, dovuti alla contaminazione da pozzetto a pozzetto durante la preparazione delle librerie e alla contaminazione da sessione a sessione tra sessioni di sequenziamento consecutive. L'analisi è stata eseguita per le varianti piccole di DNA BRCA, BRCA LR e GIS. Le librerie sono state preparate da campioni FFPE di carcinoma ovarico caratterizzati in una disposizione a scacchiera con campioni alternati per valutare la contaminazione da pozzetto a pozzetto e con indici alternati per valutare la contaminazione tra sessioni di sequenziamento consecutive sullo stesso strumento NextSeq 550Dx. Lo studio sulla contaminazione incrociata ha mostrato un tasso di contaminazione dello 0,8% (2/252 eventi di contaminazione); l'osservazione è stata effettuata esaminando le varianti rilevate in ogni campione. Non sono stati rilevati eventi di contaminazione analizzando le librerie di destinatari in base all'identificazione delle varianti per le varianti piccole di DNA BRCA e BRCA LR. I due eventi di contaminazione osservati erano falsi positivi per GIS nei campioni ricevuti GIS data la variabilità intrinseca del GIS e del fatto che il GIS di questi due campioni era vicino alla soglia decisionale.

Lo studio ha dimostrato che il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) dovrebbe avere un basso tasso di contaminazione incrociata da un pozzetto all'altro o da una sessione all'altra. Questi risultati, insieme alle metriche di contaminazione nel software, mitigano il rischio di risultati di false varianti a causa della contaminazione del campione.

Valutazione di Nucleic Acid Extraction Kit

Con TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) sono stati valutati tre kit di estrazione del DNA disponibili in commercio. I tre kit di estrazione si differenziavano per l'agente di deparaffinizzazione e per le fasi di legame dell'acido nucleico ([Tabella 53](#)). Il kit n. 3 è stato il kit di estrazione principale per la determinazione delle prestazioni di TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

Cinque campioni FFPE ovarici sono stati sottoposti all'estrazione di acido nucleico (tre kit x due operatori x tre giorni x due replicati) per ottenere il DNA (36 osservazioni totali). L'analisi qualitativa ha mostrato che non vi era alcuna differenza distinguibile nell'identificazione delle varianti per uno qualsiasi dei tipi di varianti (varianti piccole di DNA BRCA, BRCA LR, GIS), poiché tutte le osservazioni delle varianti presentavano valori PPC > 97%. L'analisi quantitativa non ha mostrato differenze significative associate ai kit per VAF di varianti piccole di DNA BRCA e GIS.

Tabella 53 Caratteristiche dei kit

Kit	Nome del kit	Agente di deparaffinizzazione	Legame dell'acido nucleico
1	Qiagen QIAamp DSP DNA FFPE Tissue	Xilene	Colonna
2	Beckman Coulter FormaPure XL DNA	Olio minerale	Microsfere magnetiche
3	Qiagen AllPrep DNA/RNA FFPE	Soluzione di deparaffinizzazione proprietaria	Colonna

Stabilità dei reagenti

Stabilità in tempo reale

La stabilità in tempo reale è stata valutata utilizzando sei campioni di tessuto di carcinoma ovarico FFPE. Sono stati analizzati tre lotti di reagenti in sei punti temporali distanziati con incrementi simili (3 mesi, 6 mesi, 9 mesi, 13 mesi, 19 mesi e 25 mesi). Due operatori hanno eseguito eventi di preparazione delle librerie per ciascun lotto, inclusi tre replicati di ciascun campione, per un totale di sei replicati per ciascun lotto. Per le varianti piccole di DNA BRCA target, il PPC aggregato era del 100%, per le varianti BRCA LR target, il PPC aggregato era $\geq 92\%$ e per le varianti GIS, il PPC aggregato era $\geq 83\%$. Inoltre, non sono state osservate differenze significative associate al tempo per GIS e la variante piccola VAF di DNA BRCA.

Stabilità durante l'uso del kit

La stabilità durante l'uso del kit del saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) è stata valutata in condizioni d'uso standard nel corso della sua vita utile per valutarne il comportamento dopo vari utilizzi. I componenti congelati del kit di reagenti sono stati sottoposti a più cicli di congelamento/scongelo e i reagenti refrigerati sono stati portati a temperatura ambiente e testati per supportare fino a quattro utilizzi del kit. Tutti i criteri di controllo qualità sono stati soddisfatti per tutti i cicli di congelamento e scongelamento e per tutti i punti temporali testati. L'identificazione delle varianti è stata valutata per le varianti piccole di DNA BRCA, BRCA LR e GIS. I risultati supportano fino a quattro cicli di congelamenti/scongelo del kit. Inoltre, è stato utilizzato un kit di reagenti per preparare un totale di 24 campioni di DNA da parte di un operatore; ciò dimostra che il volume di reagenti è sufficiente per 24 librerie di DNA e 24 librerie di HRD.

Stabilità del trasporto

La stabilità del trasporto del kit del saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) è stata valutata utilizzando nove campioni FFPE di carcinoma ovarico per mostrare la funzionalità dei kit di reagenti TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) dopo l'esposizione a condizioni di distribuzione simulate. Otto campioni FFPE di carcinoma ovarico sono stati utilizzati per mostrare la funzionalità dopo l'esposizione del kit di reagenti a profili di temperatura estivi e invernali simulati a livello internazionale. I test funzionali sono stati eseguiti post-esposizione utilizzando i campioni summenzionati e consistevano in 6-12 replicati di ciascun campione per ciascuna condizione. Sono stati osservati anche gli attributi fisici dei kit e sono risultati preservati dopo la distribuzione per tutti i casi di test. I test funzionali hanno concluso che il trasporto non ha avuto un impatto negativo sull'identificazione delle varianti per le varianti piccole di DNA BRCA (PPC $\geq 96\%$), BRCA LR (PPC $\geq 94\%$) e GIS (PPC=100%) rispetto alla condizione di controllo.

Stabilità del campione

Stabilità degli acidi nucleici

La stabilità degli acidi nucleici (DNA) e la loro quantificazione associata per l'uso con il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) sono state valutate utilizzando campioni FFPE di più tipi di tessuto. I blocchi FFPE sono stati sezionati e il DNA è stato estratto. L'acido nucleico estratto è stato accuratamente miscelato, quantificato, controllato per la qualità dell'acido nucleico e suddiviso in due set di provette monouso da congelare per due punti temporali: T0 (controllo) e T1 (per resistere 28 giorni). Tutto il DNA estratto è stato conservato a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C fino a quando non è stato analizzato a T0 o T1 con più replicati e operatori. T1 è stato confrontato con T0 per le varianti piccole di DNA BRCA, BRCA LR e GIS. I dati indicano che gli acidi nucleici e la loro quantificazione associata per l'uso con il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) sono stabili per un massimo di 28 giorni se conservati alle temperature raccomandate (da -25 °C a -15 °C).

Stabilità delle librerie

La stabilità delle librerie che utilizzano ciascuno dei cinque punti di arresto sicuri per il saggio (consultare la [Tabella 54](#)) è stata valutata utilizzando più campioni di tessuto di carcinoma ovarico FFPE e un campione di tessuto di carcinoma mammario FFPE. Le librerie di controllo (T0, nessun punto di arresto) sono state sequenziate immediatamente alla fine del flusso di lavoro. Le aliquote delle stesse librerie sono state conservate nei punti di arresto a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per il tempo (T1) a supporto dei giorni elencati nella [Tabella 54](#). T1 è stato confrontato con T0 per le varianti piccole di DNA BRCA, BRCA LR e GIS. I dati indicano che le librerie generate dal saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) sono stabili in conformità alle Istruzioni per l'uso.

Tabella 54 Tempistiche di conservazione delle librerie

Tipo di libreria	Piastra	Numero di giorni
gDNA frammentato	LP PCR	≤ 7
Pre-arricchiamento	ALS PCR	≤ 30
Post-arricchiamento	ELU2 PCR	≤ 7
PCR post-arricchiamento	PL PCR	≤ 30
Normalizzata	NL PCR	≤ 32

Stabilità del tessuto in FFPE montato su vetrino

La stabilità dei tessuti FFPE montati su vetrino da utilizzare con il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) è stata valutata sezionando blocchetti FFPE (sezioni da 5 µm) provenienti da dieci campioni di tessuto di carcinoma ovarico, montati su vetrini e conservati a temperatura ambiente (22 °C) per due intervalli di tempo: T0 (controllo) e T1 (per resistere 28 giorni). Il materiale di acido nucleico è stato quantificato e in seguito elaborato attraverso il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) entro 24 ore per ciascun punto temporale. In corrispondenza di ogni punto temporale sono stati analizzati più replicati per campione da più operatori. T1 è stato confrontato con T0 per le varianti piccole di DNA BRCA, BRCA LR e GIS. È stata valutata l'identificazione delle varianti. I dati indicano che il tessuto FFPE montato su vetrino da utilizzare con TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) è stabile a temperatura ambiente per un massimo di 28 giorni.

Studio HRD Clinical Performance Bridging

Per convalidare il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) come CDx per la selezione delle pazienti affette da carcinoma ovarico per il trattamento con LYNPARZA (olaparib), sono stati analizzati i campioni residui delle pazienti arruolate nella sperimentazione clinica PAOLA-1 (NCT02477644) per supportare uno studio Clinical Bridging.

Lo studio è stato condotto per valutare la concordanza dello stato di HRD tra il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) e il saggio valutato nella sperimentazione clinica (CTA, Clinical Trial Assay) utilizzato in PAOLA-1 e per valutare l'efficacia clinica di olaparib nei pazienti HRD-positive identificate con il saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). PAOLA-1 era uno studio multicentrico, di fase III, randomizzato, in doppio cieco, controllato verso placebo volto a valutare l'efficacia clinica di olaparib più bevacizumab come terapia di mantenimento di prima linea per le pazienti affette da carcinoma ovarico avanzato. Lo stato HRD delle pazienti è stato determinato dopo la randomizzazione prima dell'analisi primaria utilizzando il CTA. L'endpoint primario era la sopravvivenza libera da progressione (PFS), definita come il tempo dalla randomizzazione alla progressione determinata dalla valutazione dello sperimentatore utilizzando i criteri RECIST 1.1 modificati, o il decesso. Delle 806 pazienti randomizzate nello studio PAOLA-1, 399 campioni residui erano disponibili per l'analisi con TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). I dati demografici dei soggetti con risultati TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) disponibili erano simili a quelli dello studio PAOLA-1. Allo stesso modo, le caratteristiche delle partecipanti erano generalmente simili tra coloro che erano HRD-positive con TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) rispetto a coloro che erano HRD-positive mediante CTA.

Risultati di concordanza

Dei 399 campioni disponibili per l'analisi con TSO Comprehensive HRD (DRAGEN), 382 hanno prodotto un risultato valutabile. I 17 campioni non valutabili non hanno prodotto un risultato a causa di errori nel controllo qualità del test (N=12) o nella revisione patologica (N=5) (tasso di test non validi del 3% [12/394]). Un totale di 365 pazienti arruolate presentavano campioni con risultati CTA e TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) entrambi valutabili. La concordanza dei risultati TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) rispetto ai risultati CTA tra i campioni con risultati validi è mostrata nella [Tabella 55](#).

Tabella 55 Concordanza tra TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) e CTA per il rilevamento di HRD

		Risultato CTA		
		HRD positivo	HRD negativo	Totale
Risultato del saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)	HRD positivo	204	12	216
	HRD negativo	5	144	149
	Totale	209	156	365
Statistiche di concordanza	PPA% (n/N; IC al 95%*)	97,6% (204/209; 94,5%, 99,2%)		
	NPA% (n/N; IC al 95%*)	92,3% (144/156; 86,9%, 96,0%)		
	OPA% (n/N; IC al 95%*)	95,3% (348/365; 92,6%, 97,3%)		

* IC in base al metodo binomiale esatto (Clopper and Pearson, 1934).

Risultati di efficacia clinica

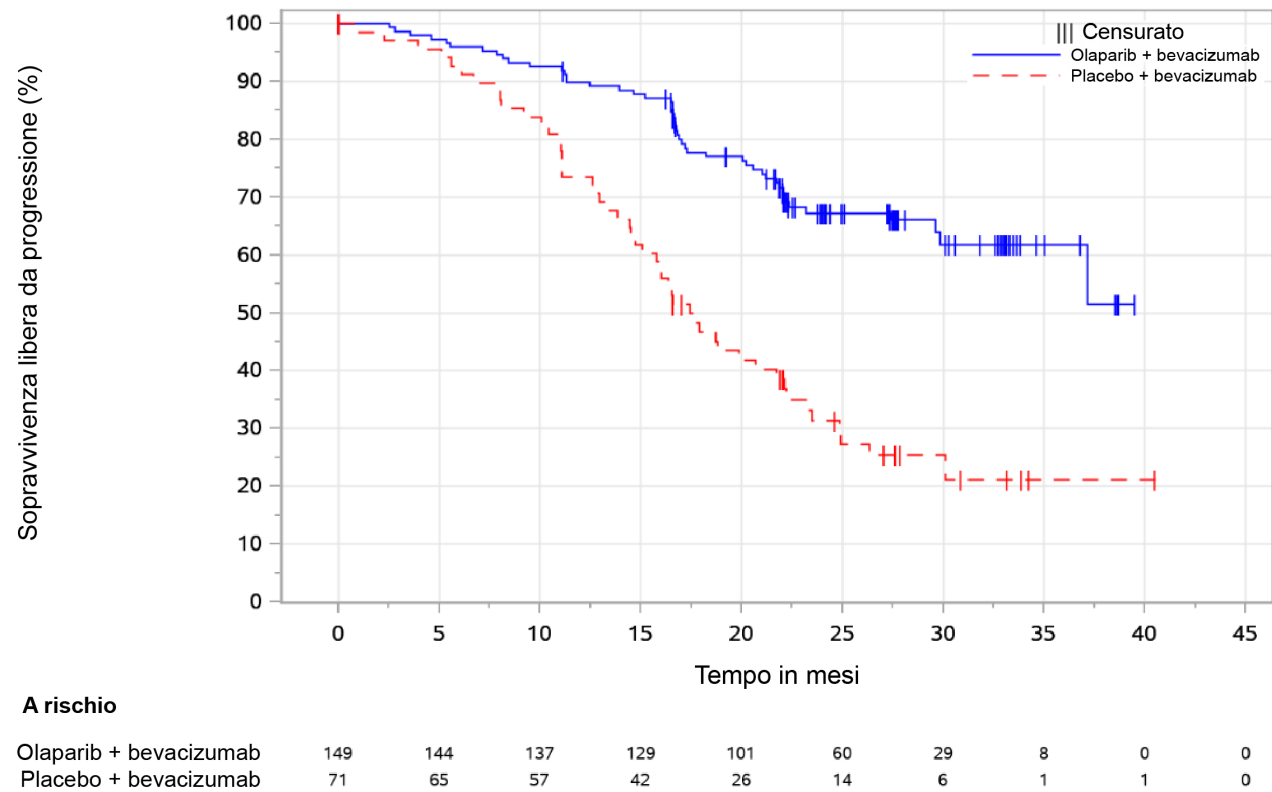
Le prestazioni cliniche di TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) sono state stabilite mediante la determinazione dell'efficacia clinica nella popolazione HRD-positiva. I rapporti di rischio per PFS (HR) per i gruppi di trattamento con olaparib rispetto al placebo sono stati calcolati utilizzando un modello dei rischi proporzionali di Cox non aggiustato. [Tabella 56](#) mostra i rapporti di rischio per PFS nei partecipanti CTA e positivi per TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) HRD. [Figura 4](#) mostra le curve di Kaplan-Meier per PFS nei partecipanti positivi per TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Nelle popolazioni CTA e positive per TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) HRD, il rapporto di rischio per PFS era rispettivamente 0,33 (IC al 95%: 0,25, 0,45) e 0,32 (IC al 95%: 0,22, 0,48) e rappresentava una riduzione del 67% e del 68% del rischio di progressione o decesso per le partecipanti nel gruppo olaparib più bevacizumab rispetto al gruppo placebo più bevacizumab. Un'analisi di sensibilità sull'efficacia dell'imputazione dei risultati CDx mancanti ha dimostrato che i valori del rapporto di rischio per PFS nelle popolazioni HRD-positive imputate erano coerenti con le stime dell'analisi primaria.

Tabella 56 Efficacia clinica nel CTA e nel saggio TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)

		HRD positivo	
		Olaparib +bev	Placebo +bev
CTA	N.	225	132
	PFS ¹ (IC al 95%) ²	37,2 (36,0, NR ⁴)	17,7 (15,8, 19,9)
	HR della PFS (IC al 95%) ³	0,33 (0,25, 0,45)	
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)	N.	149	71
	PFS ¹ (IC al 95%) ²	NR ⁴ (37,2, NR ⁴)	17,4 (14,7, 22,1)
	HR della PFS (IC al 95%) ³	0,32 (0,22, 0,48)	

¹ Mediana della PFS in mesi.
² Dal metodo del limite del prodotto (Kaplan-Meier) per i dati censurati.
³ In base al modello di regressione di Cox non stratificato con il trattamento come covariata.
⁴ NR = Non raggiunto

Figura 4 Curva di Kaplan-Meier – PFS nelle partecipanti HRD-positive identificate da TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)



Bibliografia

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(1):7-33. doi:10.3322/caac.21654.
2. Shih I-M, Wang Y, Wang T-L. The Origin of Ovarian Cancer Species and Precancerous Landscape. *Am J Pathol.* 2021;191(1):26-39. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.09.006
3. Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P, et al. Statement by the Kommission Ovar of the AGO: The New FIGO and WHO Classifications of Ovarian, Fallopian Tube and Primary Peritoneal Cancer. Stellungnahme der Organkommission Ovar der AGO: die neuen FIGO- und WHO-Klassifikationen des Ovarial-, Tuben- und primären Peritonealkarzinoms. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2015;75(10):1021-1027. doi: 10.1055/s-0035-1558079
4. Bell D, Berchuck A, Birrer M, et al. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nat.* 2011;474(7353):609-615. doi: 10.1038/nature10166
5. Pennington KP, Walsh T, Harrell MI, et al. Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2014;20(3):764-775. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2287
6. Coleman RL, Oza AM, Lorusso D, et al. Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2017;390(10106):1949-1961. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32440-6
7. González-Martín A, Pothuri B, Vergote I, et al. Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(25):2391-2402. doi: 10.1056/NEJMoa1910962
8. Ledermann J, Harter P, Gourley C, et al. Olaparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive Relapsed Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(15):1382-1392. doi: 10.1056/NEJMoa1105535
9. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, et al. Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(22):2154-2164. doi: 10.1056/NEJMoa1611310
10. Moore K, Colombo N, Scambia G, et al. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(26):2495-2505. doi: 10.1056/NEJMoa1810858
11. Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, et al. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(9):1274-1284. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30469-2
12. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, et al. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(25):2416-2428. doi: 10.1056/NEJMoa1911361
13. Norquist BM, Brady MF, Harrell MI, et al. Mutations in Homologous Recombination Genes and Outcomes in Ovarian Carcinoma Patients in GOG 218: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study. *Clin Cancer Res.* 2018;24(4):777. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1327
14. Bolton KL, Chenevix-Trench G, Goh C, et al. Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *JAMA.* 2012;307(4):382-390. doi: 10.1001/jama.2012.20

15. Moore KN, Secord AA, Geller MA, et al. Niraparib monotherapy for late-line treatment of ovarian cancer (QUADRA): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2019;20(5):636-648. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30029-4
16. Lynparza (Olaparib) Prescribing Information. *U.S. Food and Drug Administration* (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/208558s013lbl.pdf). Pubblicato nel 2014. Aggiornato a ottobre 2023. Consultato il 7 marzo 2025.
17. Kanchi KL, Johnson KJ, Lu C, et al. Integrated analysis of germline and somatic variants in ovarian cancer. *Nat Commun.* 2014;5:3156-3156. doi: 10.1038/ncomms4156
18. Swisher EM, Lin KK, Oza AM, et al. Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(1):75-87. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30559-9

Cronologia delle revisioni

Documento	Data	Descrizione della modifica
Documento n. 200080934 v00	Maggio 2026	Versione iniziale.

Brevetti e marchi di fabbrica

Questo documento e il suo contenuto sono di proprietà di Illumina, Inc. e delle aziende a essa affiliate ("Illumina") e sono destinati esclusivamente a uso contrattuale da parte dei clienti di Illumina, per quanto concerne l'utilizzo dei prodotti qui descritti, con esclusione di qualsiasi altro scopo. Questo documento e il suo contenuto non possono essere usati o distribuiti per altri scopi e/o in altro modo diffusi, resi pubblici o riprodotti, senza previa approvazione scritta da parte di Illumina. Mediante questo documento, Illumina non trasferisce a terzi alcuna licenza ai sensi dei suoi brevetti, marchi, copyright o diritti riconosciuti dal diritto consuetudinario, né diritti simili di alcun genere.

Al fine di garantire un uso sicuro e corretto dei prodotti ivi descritti, le istruzioni riportate nel presente documento devono essere scrupolosamente ed esplicitamente seguite da personale qualificato e adeguatamente formato. Leggere e comprendere a fondo l'intero contenuto di questo documento prima di usare tali prodotti.

LA LETTURA INCOMPLETA DEL CONTENUTO DEL PRESENTE DOCUMENTO E IL MANCATO RISPETTO DI TUTTE LE ISTRUZIONI IVI CONTENUTE POSSONO CAUSARE DANNI AL/I PRODOTTO/I, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI E RENDERANNO NULLA QUALSIASI GARANZIA APPLICABILE AL/I PRODOTTO/I.

ILLUMINA DECLINA QUALSIASI RESPONSABILITÀ DERIVANTE DALL'USO IMPROPRIO DEL/DEI PRODOTTO/I IVI DESCRITTO/I (INCLUSI SOFTWARE O PARTI DI ESSI).

© 2026 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, consultare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.

Informazioni di contatto



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE
2797



Etichettatura del prodotto

Per un riferimento completo dei simboli che si trovano sulla confezione del prodotto e sull'etichettatura, consultare la legenda dei simboli alla pagina web support.illumina.com nella scheda *Documentation* (Documentazione) per il kit in uso.

Un riepilogo su sicurezza e prestazioni (Summary of Safety and Performance, SSP) è disponibile alla pagina web <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, dopo il lancio del database European Database on Medical Devices (Eudamed). È collegato all'UDI-DI di base (0081627002TSOHRDDGRK).