



SarcomaFusion



Istruzioni per l'uso GENEXPATH SarcomaFusion.

Precauzioni per l'uso.

CE

IVD

Dispositivo medico-diagnostico *in vitro* secondo la direttiva (UE) 98/79/CE

Per uso diagnostico *in vitro*

È riservato all'uso professionale.

Leggere tutte le informazioni su questo foglio prima dell'uso .

Contatti :

Produttore: GENEXPATH

+33 (0)2.78.08.98.69

113 Avenue des Martyrs de la Résistance

76100 Rouen - Francia

contact@genexpath.com

support@genexpath.com

Precauzioni importanti.....	5
Raccomandazioni generali	5
Pittogrammi	5
Destinazione d'uso	6
Principio del test.....	6
Reagenti	8
Contenuto del kit di reagenti GENEXPATH SarcomaFusion	8
Formato dei kit di reagenti commercializzati e quantità	8
Reagenti non inclusi nel kit di reagenti	9
Materiali richiesti	9
Prima di iniziare	10
Campioni biologici	10
Programmazione di termociclatori.....	10
Programma 1: Pre PCR	10
Programma 2 : PCR.....	11
Protocollo dettagliato	11
Passo 1: Trascrizione inversa.....	11
Reagenti richiesti	11
Trascrizione inversa	11
Fase 2: Ibridazione delle sonde	12
Reagenti richiesti	12
Ibridazione di sonde	12
Etape 3 : Legatura	13
Reagenti richiesti	13
Legatura	13
Fase 4: Amplificazione e incorporazione di codici a barre e adattatori.....	14
Reagenti richiesti	14
Amplificazione	14
Fase 5: Purificazione e dosaggio delle librerie di sequenziamento.....	15
Reagenti richiesti	15
Passo 5.a: Purificazione delle librerie di sequenziamento	15
Passo 5.b: Determinazione delle librerie di sequenziamento	15

Fase 6: Diluizione, pooling e sequenziamento delle librerie.....	15
Reagenti richiesti	16
Sequenziamento su un sequenziatore Illumina MiSeq	16
• Passo 6.a: Diluizione e pool di librerie.....	16
• Passo 6.b: Denaturazione e diluizione del pool di librerie	16
• Fase 6.c: Preparazione degli starter di sequenziamento.....	16
• Fase 6.d: Preparazione del foglio di iniezione	17
• Passo 6.e: Inizia il sequenziamento	17
Sequenziamento su una piattaforma NextSeq 500/550 Illumina	17
• Passo 6.a: Diluizione e pool di librerie.....	17
• Passo 6.b: Denaturazione e diluizione del pool di librerie	18
• Passo 6.c: Preparazione dei primer di sequenziamento	18
• Fase 6.d: Preparazione del foglio di iniezione	18
• Passo 6.e: Inizia il sequenziamento	18
Fase 7: Analisi dei risultati.....	19
Limitazioni della procedura.....	19
Caratterizzazione delle prestazioni.....	20
Prestazioni analitiche su campioni di riferimento.....	20
Tabella 1: Sintesi dei risultati.....	20
Prestazioni analitiche su una coorte di pazienti	21
Ripetibilità	21
<i>Ripetibilità intra-run</i>	21
<i>Ripetibilità inter-runs</i>	22
Riproducibilità	23
Sensibilità analitica.....	23
Bibliografia	24
Tabella dei simboli	25
Note	25

Precauzioni importanti.

Raccomandazioni generali .

- Può essere utilizzato per la diagnostica *in vitro*
- Seguire le buone pratiche di laboratorio per la manipolazione dei prodotti PCR (indossare camici e guanti monouso, delineare aree dedicate pre e post-PCR, utilizzare coni filtranti).
- Prendere inoltre precauzioni per evitare la contaminazione da nucleasi che possono indurre la degradazione dell'RNA e del DNA (utilizzare materiali di consumo e reagenti privi di nucleasi).
- Assicurarsi che i termociclatori siano in buone condizioni di funzionamento e calibrati secondo le raccomandazioni del produttore.
- È particolarmente importante non sostituire i reagenti non forniti nel kit, in particolare i tamponi e gli enzimi utilizzati per le fasi di trascrizione inversa, legatura e amplificazione PCR. Devono essere rispettati anche i tempi e le temperature di incubazione, nonché i volumi e le concentrazioni.
- Il kit di test **SarcomaFusion** contiene un controllo GAPDH positivo interno. Si consiglia vivamente di eseguirlo per convalidare la buona realizzazione della tua esperienza.
- I reagenti **GENEXPATH SarcomaFusion** sono destinati all'uso solo sulle piattaforme di sequenziamento Miseq o Nextseq 500/550 di Illumina.
- Le schede di dati di sicurezza sono disponibili nell'area utente.
- Se l'utente rileva errori nelle istruzioni fornite: Invia un'e-mail a contact@genexpath.com.
- Qualsiasi incidente grave in relazione al dispositivo deve essere notificato a noi [all'indirizzo contact@genexpath.com](mailto:contact@genexpath.com).

Pittogrammi



Punti importanti e passaggi critici nel protocollo che possono compromettere la qualità dei risultati.



Passaggi in cui il protocollo può essere sospeso.

Destinazione d'uso

Questo protocollo è destinato all'implementazione del test **SarcomaFusion GENEXPATH**. Consente di preparare librerie di sequenziamento per sequencer Illumina come MiSeq o NextSeq 500/550.

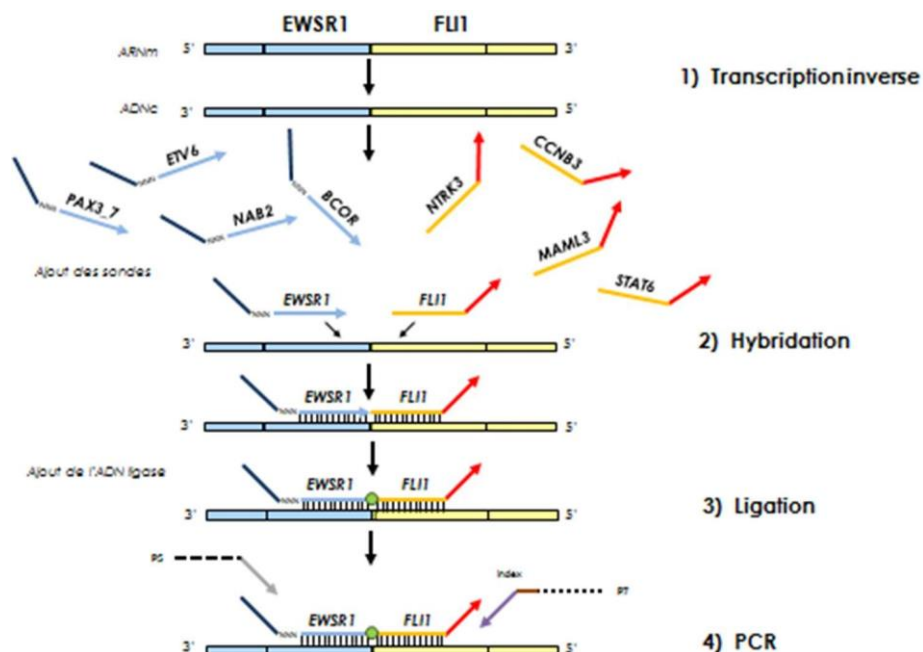
I file fastQ generati utilizzando questo test contengono dati relativi al conteggio delle sequenze corrispondenti all'eventuale presenza di un trascritto di fusione, cioè la legatura di due sonde e la loro amplificazione.

Possono essere analizzati utilizzando il software **GENEXPATH RT-MIS**, che ospita una specifica applicazione di demultiplexing delle sequenze.

Questo test consente, attraverso lo studio di 138 geni, la rilevazione di trascritti di fusione trovati in 58 tipi di tumori ossei e dei tessuti molli.

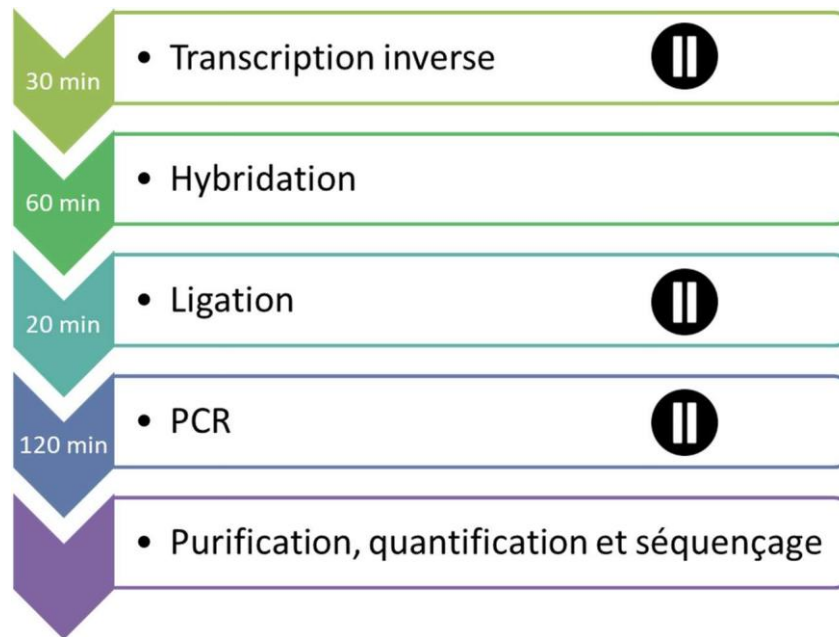
Principio del test.

Il test **SarcomaFusion GENEXPATH** si basa su un metodo RT-PCR (LD-RT-PCR) legato-dipendente. Questa tecnica semi-quantitativa consente di rilevare traslocazioni cromosomiche utilizzando specifiche coppie di sonde oligonucleotidiche. Una coppia di sonde per un gene di controllo (GAPDH) è inclusa nella miscela di sonde di prova e quindi esegue un controllo interno all'esperimento.



Da un estratto di RNA totale, quattro passaggi sono sufficienti per ottenere le librerie.

- Passaggio di trascrizione inversa (RT).
- Una fase di ibridazione di specifiche sonde oligonucleotidiche.
- Uno stadio di legatura.
- Una fase di amplificazione PCR.



Non è necessaria alcuna purificazione fino a quando non si ottengono le librerie, il che limita le perdite di materiale e garantisce un'ottima sensibilità a questa tecnica. Inoltre, le sequenze genetiche bersaglio delle sonde sono particolarmente brevi (tra 40 e 60 basi) che garantiscono un'ottima robustezza rispetto alla degradazione dell'RNA.

LD-RT-PCR è quindi un approccio particolarmente adatto per l'analisi di campioni biologici difficili come biopsie fisse e di tessuto paraffina.

Per ogni campione sono sufficienti circa 10^{-5} sequenze per ottenere un profilo di espressione analizzabile, permettendo di testare un gran numero di campioni in parallelo sullo stesso FlowCell di sequenziamento. **Le librerie SarcomaFusion GENEXPATH** possono anche essere caricate contemporaneamente ad altre librerie di sequenziamento, generate con altri metodi.

Reagenti.

Contenuto del kit di reagenti GENEXPATH SarcomaFusion.

GENEXPATH Sarcoma Probe Mix	GEP-SFPM
Codici a barre GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-BC-xxx
GENEXPATH SarcomaFusion avvio della sequenza	GEP-SP-001

Codici a barre GAPDH GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-BCC-xxx
Avvio della sequenza GAPDH GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-SP-002

XXX : n° il codice a barre

Al ricevimento, questi reagenti devono essere conservati tra -25 ° C e -15 ° C.

Sono pronti all'uso e non hanno bisogno di essere diluiti.

La durata di conservazione dei reagenti è di 1 anno.

Tornare alle condizioni di conservazione immediatamente dopo l'uso.

Non utilizzare reagenti dopo la data di scadenza che è riportata sull'etichetta.

Formato dei kit di reagenti commercializzati e quantità:

	Kit reagenti - U = numero di analisi			
	8U	16U	24U	48U
Mix delle sonde GEP-SFP M	30 µL	48 µL	54 µL	108 µL
Codici a barre GEP-BC-xxx (da 001 a 032 a seconda del numero di test acquistati) BC=codice a barre	8 BC	8 BC	12 BC	24 BC
	N°017 a 024	N°001 a 008	N°021 a 032	Da 001 a 024
	5 µL/BC	9 µL/BC	9 µL/BC	9 µL/BC
avvio della sequenza GEP-SP-001	60 µL	96 µL	144 µL	288 µL
Per il controllo interno				
Codici a barre GAPDH GEP-BCC-XXX (da 001 a 032 a seconda del numero di test acquistati) BCC=codice a barre di controllo	8 BCC	8 BCC	12 BCC	24 BCC
	N°017 a 024	N°001 a 008	N°021 a 032	Da 001 a 024
	5 µL/BCC	9 µL/BCC	9 µL/BCC	9 µL/BCC
avvio della sequenza GAPDH GEP-SP-002	60 µL	96 µL	144 µL	288 µL

I reagenti sono forniti in quantità maggiori rispetto all'effettivo fabbisogno. Alla fine del numero di analisi ordinate, devono essere scartate. Se viene effettuato un nuovo ordine, i reagenti verranno consegnati di conseguenza.

Per un kit di reagenti di oltre 8 analisi, ogni codice a barre verrà utilizzato per 2 diverse analisi.

Reagenti non inclusi nel kit di reagenti:

Reagenti	Fornitori e referenze
Kit di sintesi cDNA SuperScript™ VILO™	Invitrogen, rif 11754250
SALSA MLPA Tampone	MRC Olanda, rif SMR33
SALSA Ligase Tampone A	MRC Olanda, rif SMR12
SALSA Ligase Tampone B	MRC Olanda, rif SMR13
SALSA Ligasi 65	MRC Olanda, rif SMR20
Red'y' Star PCR Mix	Eurogentec, rif PK-0073-02R
AMPure XP (sfere magnetiche)	Beckman Coulter, rif A63880
Saggio Qubit® dsDNA HS	Fisher Scientific, rif 10616763
Reagenti di sequenziamento	Illumina
Tampone TE (10 mM Tris-Acetato pH 8,0, 1mM EDTA)	Variabile
Etanolo 100%	Variabile
NaOH 1 N	Variabile
Tris Tampone 200 mM pH 7	Variabile
Nuclease free water	Variabile

Al ricevimento e tra ogni utilizzo, questi reagenti devono essere conservati secondo le raccomandazioni dei vari fornitori.

Materiali richiesti:

Hardware	Fornitori e referenze
Termociclatore in zona pre-PCR	Variabile
Termociclatore in zona post-PCR	Variabile
Fluorometro Qubit® (o equivalente)	Thermo Fisher Scientific, rif Q33238
Tubi di dosaggio Qubit®	Fisher Scientific, rif 12037609
DynaMag-96™ Side Magnet - Placca magnetica (purificazione AMPure XP)	Thermo Fisher Scientific, rif 12331D
Tubi e placche PCR 200 µL	Variabile

Prima di iniziare.

Campioni biologici.

Il test **GENEXPATH SarcomaFusion** viene utilizzato per preparare librerie di sequenziamento da RNA totale estratto da tessuti o biopsie tumorali di sarcomi (tumori ossei e dei tessuti molli).

Questi campioni possono essere freschi, congelati o fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE).

Per l'estrazione di RNA da tessuti fissi, si consiglia di utilizzare il kit Promega Maxwell® RSC RNA FFPE (Promega, ref AS1440 e AS4500).

La quantità di RNA da analizzare dovrebbe essere compresa tra **50 e 500 ng, in un volume di 2,5 µL**. Se la concentrazione delle soluzioni da analizzare è troppo elevata, questi RNA possono essere diluiti con Nuclease-free water.

Programmazione di termociclatori.

Per limitare il rischio di contaminazione, utilizzare due termociclatori, uno nella zona pre-PCR e uno nella zona post-PCR.

Sono necessari due programmi:

- Il primo consente di eseguire le prime tre fasi del protocollo: **trascrizione inversa dell'RNA in cDNA, ibridazione di sonde oligonucleotidiche e legatura**. Deve essere implementato nel termociclatore situato nella zona pre-PCR.
- Il secondo consente di amplificare i prodotti di legatura e di incorporare i codici a barre e gli adattatori necessari per il sequenziamento. Deve essere implementato nel termociclatore situato nella zona post-PCR.

Programma 1: Pre PCR.



Poiché i volumi di reazione sono bassi, assicurarsi che la temperatura del coperchio di riscaldamento del termociclatore rimanga ad un livello elevato (95 ° C) in tutte le fasi del programma per evitare l'evaporazione.

Sono previsti intervalli di interruzione di 4°C o 54°C tra le diverse fasi del programma per consentire l'aggiunta dei reagenti necessari.

Fase 1: Trascrizione inversa dell'RNA in cDNA.

- Coperchio riscaldante: 95°C
- 10 minuti 25°C
- 60 minuti a 42°C
- 5 minuti 85°C
- 4°C infinito

Fase 2: Ibridazione delle sonde.

- Coperchio riscaldante: 95°C
- 2 minuti 95°C
- 60°C infinity (ibridazione 1h)

Fase 3 : Legatura.

- Coperchio riscaldante: 95°C
- 54°C infinity (distribuzione della miscela di legatura)
- 15 minuti 54°C
- 5 minuti 98°C
- 4°C infinito

Programma 2 : PCR.

- Coperchio riscaldante: 95°C
- 6 minuti 94°C
- 35 x (30 secondi 94°C; 30 secondi 58°C; 30 secondi 72°C)
- 4 minuti 72°C
- 4°C infinito

Protocollo dettagliato.**Passo 1: Trascrizione inversa.**

Questo passaggio deve essere eseguito nell'area pre-PCR.

Reagenti richiesti.

- Miscela di reazione Vilo 5X, super script 10X (SuperScript Vilo cDNA Synthesis Kit), nuclease-free water, estratto totale di RNA da testare (da 25 a 250 ng/μL).



Si raccomanda di eseguire l'intera procedura in tubi o piastre PCR da 200 μL.

Trascrizione inversa.

- Scongellare i seguenti reagenti e conservarli su ghiaccio o su un rack di raffreddamento: 5X Vilo reaction mix e 10X super script.
- Preparare un mix di trascrizione inversa. Per ciascun campione, miscelare (per un volume totale di 3 μL per reazione):
 - 5X Miscela di reazione Vilo 1 μL
 - Nuclease free water 1 μL
 - 10X super script 0,5 μL
- Erogare questa miscela in provette PCR da 200 μL (2,5 μL per tubo) conservate su ghiaccio o su un rack di raffreddamento.
- Aggiungere 2,5 μL di ciascuna delle soluzioni totali di RNA alle diverse provette.

- Vortex, centrifugare brevemente.
- Posizionare i tubi nel termociclatore situato nella zona pre-PCR e procedere alla **fase 1 del programma Pre-PCR** (Trascrizione inversa di RNA in cDNA).



Quindi procedere direttamente al punto 2 o conservare i prodotti di legatura tra -25 ° C e -15 ° C.

Fase 2: Ibridazione delle sonde.

Questo passaggio deve essere eseguito nell'area pre-PCR.

Reagenti richiesti.

- Mix delle sonde **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SFPM), SALSA MLPA Tampone

Ibridazione di sonde.

- **Alla fine del passaggio 1, quando** la temperatura del termociclatore è scesa a 4 ° C, rimuovere i tubi, centrifugarli brevemente e posizionarli sul ghiaccio o su un rack di raffreddamento.
- Scongelare il tampone Salsa MLPA e mix delle sonda **GENEXPATH SarcomaFusion**, quindi conservare su ghiaccio o su un rack di raffreddamento.
- Preparare un mix di ibridazione. Per ciascun campione, miscelare (per un volume totale di 3 µL per reazione):
 - o Salsa MLPA Tampone 1,5 µL
 - o Mix della sonde **GENEXPATH SarcomaFusion** 1,5 µL
- Vortex, centrifugare brevemente.
- Aggiungere 3 µL di questa miscela a ciascuna delle provette di cDNA.
- Centrifugare brevemente.
- Riportare i tubi in termociclatore.
- Controllare la temperatura del coperchio riscaldante (95°C).
- Procedere al **punto 2 del programma pre-PCR** (ibridazione delle sonde).

Etape 3 : Legatura.

Questo passaggio deve essere eseguito nell'area pre-PCR.

Reagenti richiesti.

- SALSA Ligase Tampone A, SALSA Ligase Tampone B, SALSA Ligase 65, acqua nuclease free .

Legatura.

- 15 minuti prima della fine del punto 2, scongelare i tamponi SALSA Ligase Tampone A e SALSA Ligase Tampone B e conservarli su ghiaccio o su un rack di raffreddamento.
- Porre l'enzima SALSA ligasi 65 su ghiaccio o su un rack di raffreddamento.
- Preparare un mix di legatura. Per ciascun campione, miscelare (per un volume totale di 32 μ L per reazione):
 - o Nuclease free water 25 μ L
 - o Salsa Ligase Tampone A 3 μ L
 - o Salsa Ligase Tampone B 3 μ L
- Vortex, centrifugare brevemente
 - o Salsa Ligasi 65 1 μ L
- Vortex, centrifugare brevemente.
- Alla fine dei 60 minuti di incubazione, procedere alla **fase 3 del programma pre-PCR (legatura)**.
- Abbassare la temperatura del coperchio riscaldante a 54°C.
- Aggiungere 32 μ L della miscela di legatura direttamente in ciascun tubo, senza estrarli dal blocco riscaldante.
- Dopo la distribuzione della miscela, procedere alla fase successiva del programma (15 minuti a 54 ° C, 5 minuti a 98 ° C).



Al termine di questa fase, quando la temperatura del blocco PCR è scesa a 4°C procedere immediatamente alla fase 4 (amplificazione PCR) o congelare i prodotti di legatura (tra -25°C e -15°C).



Dopo questa fase, non conservare i prodotti a temperature più elevate (ad es. 4°C o temperatura ambiente) per evitare legature non specifiche che potrebbero derivare dall'attività residua dell'enzima.

Fase 4: Amplificazione e incorporazione di codici a barre e adattatori.

In questa fase, i prodotti di legatura vengono amplificati mediante PCR grazie alle code aggiuntive presenti alle estremità delle sonde. Queste amplificazioni vengono eseguite utilizzando coppie di primer forniti nei tubi di Barcodes **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BC-xxx).

Per consentire l'analisi di più campioni sulla stessa FlowCell, il primer 3' PCR trasporta un codice a barre molecolare che verrà riconosciuto dall'algoritmo di demultiplexing della piattaforma **GENEXPATH RT-MIS**.

Per eseguire il controllo interno con le sonde GAPDH, vengono eseguite due diverse PCR, quindi è necessario duplicare il numero di provette. Per un determinato campione, per l'analisi al computer è necessario utilizzare lo stesso numero di codice a barre GEP-BC-xxx e GEP-BCC-xxx. Quindi è necessario aggiungere, per ogni campione, in una provetta il codice a barre GEP-BC-xxx e nell'altra il codice a barre GEP-BCC-xxx associato.

Reagenti richiesti.

- Codici a barre GENEXPATH SarcomaFusion (GEP-BC-xxx), Codici a barre GAPDH **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BCC-xxx), Red'y' Star PCR Mix, acqua nuclease free.

Amplificazione.

- Preparare un mix di amplificazione nella zona pre-PCR. Per ciascun campione, miscelare (per un volume totale di 18 µL per reazione):
 - o Red'y' Star PCR Mix 12,5 µL
 - o Acqua Nuclease free 5,5 µL
- Vortex, centrifugare brevemente.
- Distribuire 18 µL di questa miscela di amplificazione in diversi pozzetti di una piastra PCR.
- Aggiungere 5 µL dei prodotti di legatura generati nella fase 3 a ciascuno dei pozzetti.
- Aggiungere 2 µL di codice a barre **SarcomaFusion GENEXPATH** (GEP-BC-xxx o GEP-BCC-xxx a seconda del test).



Utilizzare codici a barre BEP-BC-xxx diversi per ciascuno dei campioni testati, ma per lo stesso campione, utilizzare lo stesso numero per BEP-BC-xxx e GEP-BCC-xxx.

- Posizionare la piastra nel termociclatore nella zona post-PCR.
- Avviare il **Programma 2** (PCR).



Al termine del programma, quando la temperatura del termociclatore è scesa a 4°C, procedere rapidamente alla fase 5 (Purificazione) oppure congelare i prodotti di amplificazione tra -25°C e -15°C.



Non conservare questi prodotti per periodi prolungati a temperature più elevate (ad es. 4°C nel termociclatore o a temperatura ambiente).

Fase 5: Purificazione e dosaggio delle librerie di sequenziamento.

Alla fine della fase di amplificazione, le librerie di sequenziamento devono essere purificate per rimuovere primer PCR e nucleotidi non incorporati. Questa purificazione viene effettuata utilizzando perline magnetiche AMPure XP. Le librerie devono quindi essere dosate mediante fluorimetria con il kit Qubit® dsDNA HS prima di essere caricate sul sequenziatore.

Reagenti richiesti.

- Etanolo 100%, Acqua nuclease free, perline AMPure XP, tampone TE (10 mM Tris-Acetate pH 8.0, 1 mM EDTA), Qubit® dsDNA HS Assay.

Passo 5.a: Purificazione delle librerie di sequenziamento.



Assicurarsi che le sfere siano completamente risospese prima dell'uso.

- Purificare 25 µL di prodotti PCR con 45 µL di perline AMPure XP (seguendo le raccomandazioni del fornitore).
- Eleggere prodotti PCR purificati in 50 µL di tampone TE.



Dopo la purificazione, le librerie possono essere memorizzate tra -25 °C e -15 °C prima del sequenziamento.

Passo 5.b: Determinazione delle librerie di sequenziamento.

- Dosare 10 µL di ciascuna libreria di sequenziamento della fluorimetria utilizzando il saggio Qubit® dsDNA HS.

Fase 6: Diluizione, pooling e sequenziamento delle librerie.

Dopo la purificazione, le librerie **SarcomaFusion GENEXPATH** devono essere diluite, raggruppate e caricate sul sequenziatore.



Per risultati ottimali, è necessario leggere un minimo di¹⁰⁻⁵ sequenze per ogni campione.

A differenza della maggior parte delle librerie di sequenziamento convenzionali, la lettura dei codici a barre molecolari necessaria per demultiplex delle sequenze **SarcomaFusion GENEXPATH** viene eseguita durante la lettura 1. Queste sequenze non vengono quindi demultiplexate automaticamente dal sequenziatore e verranno salvate nei file fastQ

"Undetermined". Il demultiplexing viene effettuato grazie allo specifico algoritmo messo a disposizione sulla piattaforma **GENEXPATH RT-MIS**.

Reagenti richiesti.

- Primer per sequenziamento **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001), primer per sequenziamento di controllo **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-002) (se eseguito il controllo interno), reagenti per sequenziamento Illumina.

Sequenziamento su un sequenziatore Illumina MiSeq.

Per informazioni dettagliate sulla diluizione e la denaturazione delle librerie, la preparazione del primer di sequenza, il foglio di iniezione e l'inizio del sequenziamento, fare riferimento alla guida Illumina del sistema Miseq.

- *Passo 6.a: Diluizione e pool di librerie.*

- Diluire ciascuna delle librerie **GENEXPATH SarcomaFusion** ad una concentrazione compresa tra 2 nM e 4 nM, considerando una dimensione media del frammento amplificata di 150 bp.
- Raggruppare le librerie **GENEXPATH SarcomaFusion** in equivolume.
- Se altre librerie sono sequenziate sulla stessa cella di flusso, regolare le concentrazioni dei diversi pool e combinarle per ottenere i numeri di sequenza desiderati (minimo 10^5 sequenze per ogni libreria **SarcomaFusion GENEXPATH**).

Esempio: Per un pool di 10 librerie **GENEXPATH SarcomaFusion** che richiedono 1 M sequenze (10^5 sequenze per ogni libreria), sequenziate con un pool di librerie B alla stessa concentrazione e che richiedono 3 sequenze M, mescolare 1 μ L del pool di librerie **GENEXPATH SarcomaFusion** e 3 μ L del pool di librerie B.

- *Passo 6.b: Denaturazione e diluizione del pool di librerie.*

- Denaturare e diluire la vasca finale seguendo le raccomandazioni della guida Illumina del sistema Miseq, per ottenere una concentrazione di carico finale tra le 8 e le 10 pM.

- *Fase 6.c: Preparazione degli starter di sequenziamento.*

- Se il pool di librerie **GENEXPATH SarcomaFusion** viene sequenziato da solo, diluire 3 μ L di ciascun primer sequenziale **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 e GEP-SP-002, se controllo interno) in un volume finale di 600 μ L di tampone HT1, quindi depositare questi 600 μ L nel pozzo 18 della cartuccia del reagente MiSeq.
- Se il pool di librerie **GENEXPATH SarcomaFusion** è caricato con altre librerie sequenziate utilizzando primer di sequenziamento Illumina, convogliare l'intero contenuto del pozzo 12 (circa 600 μ L), aggiungere 3 μ L di ciascun primer **sequenziale**

GENEXPATH SarcomaFusion (GEP-SP-001 e GEP-SP-002, se controllo interno) e ridepositare questa miscela nel pozzo 18 della cartuccia.

- **Fase 6.d: Preparazione del foglio di iniezione.**

- Se la libreria **SarcomaFusion GENEXPATH** viene sequenziata da sola, eseguire il foglio di iniezione per generare il FASTQ fornendo 120 cicli in lettura 1.
- Se le librerie SarcomaFusion GENEXPATH sono combinate con altre librerie di sequenziamento, generare il foglio di iniezione utilizzando i parametri usuali, senza compilare i campioni **GENEXPATH SarcomaFusion**.
- Specificare l'utilizzo di custom durante la configurazione dell'esecuzione (With Local Run Manager, nella pagina Crea esecuzione. In modalità di esecuzione manuale, nella schermata Esegui installazione).



In tutti i casi, assicurarsi che la lettura in lettura 1 sia eseguita con un minimo di 120 cicli e che sia selezionata la casella Custom Primer for Read 1.

- In tutti i casi, le sequenze delle librerie GENEXPATH **SarcomaFusion** non saranno demultiplexate dal sequenziatore ma saranno registrate nel file FastQ "Undetermined", che dovrà poi essere caricato sulla piattaforma **GENEXPATH RT-MIS**.

- **Passo 6.e: Inizia il sequenziamento.**

- Avviare il sequenziamento seguendo la procedura descritta nella guida Illumina del sistema MiSeq.

Sequenziamento su una piattaforma NextSeq 500/550 Illumina.

Per informazioni dettagliate sulla diluizione e la denaturazione delle librerie, la preparazione del primer di sequenza, il foglio di iniezione e l'inizio del sequenziamento, fare riferimento alla guida Illumina del sistema NextSeq.

- **Passo 6.a: Diluizione e pool di librerie.**

- Diluire ciascuna delle librerie **GENEXPATH SarcomaFusion** a una concentrazione compresa tra 0,5 nM e 4 nM, considerando una dimensione media del frammento amplificata di 150 bp.
- Raggruppare le librerie **GENEXPATH SarcomaFusion** in equivolume.
- Se altre librerie sono sequenziate sulla stessa cella di flusso, regolare le concentrazioni dei diversi pool e combinarle per ottenere i numeri di sequenza desiderati (minimo 10^5 sequenze per ogni libreria **SarcomaFusion GENEXPATH**).

Esempio: Per un pool di 10 librerie GENEXPATH SarcomaFusion che richiedono 1 M sequenze (10^5 sequenze per ogni libreria), sequenziate con un pool di librerie B alla stessa

concentrazione e che richiedono 3 sequenze M, mescolare 1 μL del pool di librerie **GENEXPATH SarcomaFusion** e 3 μL del pool di librerie B.

- **Passo 6.b: Denaturazione e diluizione del pool di librerie.**

- Denaturare e diluire il pool finale seguendo le raccomandazioni della guida Illumina del sistema NextSeq, per ottenere una concentrazione di carico finale compresa tra 0,8 pM e 1 pM.

- **Passo 6.c: Preparazione dei primer di sequenziamento.**

- Se il pool di librerie **GENEXPATH SarcomaFusion** viene sequenziato da solo, diluire 6 μL di ciascun primer di sequenziamento **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 e GEP-SP002, se controllo interno) in un volume finale di 2000 μL di tampone HT1 e depositare questi 2 ml nel pozzo 7 della cartuccia del reagente NextSeq.
- Se il pool di librerie **GENEXPATH SarcomaFusion** è combinato con altre librerie sequenziate utilizzando primer sequenziali Illumina, convogliare l'intero contenuto del pozzetto 20 (circa 2 ml), aggiungere 6 μL di ciascun primer sequenziale **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 e GEP-SP-002, se controllo interno) e ridepositare questa miscela nel pozzo 7 della cartuccia.

- **Fase 6.d: Preparazione del foglio di iniezione.**

- Se la libreria **SarcomaFusion GENEXPATH** viene sequenziata da sola, eseguire il foglio di iniezione per generare il FASTQ fornendo 120 cicli in lettura 1.
- Se le librerie **SarcomaFusion GENEXPATH** sono combinate con altre librerie di sequenziamento, generare il foglio di iniezione utilizzando i parametri usuali, senza compilare i campioni **GENEXPATH SarcomaFusion**.
- Specificare l'utilizzo di custom durante la configurazione dell'esecuzione (With Local Run Manager, nella pagina Crea esecuzione. In modalità di esecuzione manuale, nella schermata Esegui installazione).



In tutti i casi, assicurarsi che la lettura in lettura 1 sia eseguita con un minimo di 120 cicli e che sia selezionata la casella Custom Primer for Read 1.

- In tutti i casi, le sequenze delle librerie **GENEXPATH SarcomaFusion** non verranno demultiplexate dal sequenziatore ma verranno salvate nei quattro file FastQ "Undetermined", che dovranno poi essere caricati sulla piattaforma **GENEXPATH RT-MIS**.

- **Passo 6.e: Inizia il sequenziamento.**

- Avviare il sequenziamento seguendo la procedura descritta nella Guida di NextSeq System Illumina.

Fase 7: Analisi dei risultati.

I file di sequenza generati dalla piattaforma di sequenziamento Illumina (MiSeq o NextSeq), in formato FastQ, devono quindi essere analizzati utilizzando il software **GENEXPATH RT-MIS** disponibile online al seguente indirizzo: <https://connect.genexpath.com/>.



Per facilitare il download del file FastQ, non deve essere decompresso (fastq.gz).

Questo software è una soluzione bioinformatica completa che integra diversi algoritmi di elaborazione dei dati. Esegue il demultiplexing consentendo l'assegnazione di sequenze ad ogni campione. Esegue quindi una precisa identificazione dei marcatori di espressione genica e la loro quantificazione.

Il test **GENEXPATH SarcomaFusion** si basa su una quantificazione di marcatori qualitativi che caratterizzano la presenza o l'assenza di traslocazioni cromosomiche.

GENEXPATH RT-MIS genera report concisi e trasparenti che vanno dall'implementazione delle reazioni di sequenziamento all'analisi automatizzata dei risultati del sequenziamento.

GENEXPATH RT-MIS richiede il caricamento dei file sequencer in formato FASTQ e dell'elenco dei codici a barre utilizzati durante l'esperimento.

GENEXPATH RT-MIS valuta la qualità del sequenziamento di ciascun campione quantificando il numero di letture identificate e il numero di UMI (identificatore molecolare unico) rilevato.

GENEXPATH RT-MIS genera per ogni campione un rapporto di analisi che indica la presenza o l'assenza di un trascritto di fusione, il numero di letture e UMI ottenuti, nonché un riferimento bibliografico corrispondente al trascritto (nel caso in cui sia stata rilevata una fusione). Questi dati sono disponibili per il download.

GENEXPATH RT-MIS include un manuale utente direttamente accessibile online per facilitare la gestione dello strumento, per descrivere tutti i risultati generati e per dettagliare la presentazione dei risultati.

GENEXPATH non memorizza i risultati generati dal software **GENEXPATH RT-MIS** in modo sostenibile. I dati devono essere scaricati direttamente dopo ogni analisi e memorizzati dall'utente nel suo sistema di gestione documentale.

Limitazioni della procedura

- Il test SarcomaFusion è stato sviluppato a partire dai dati della letteratura per rilevare le trascrizioni di fusione più comuni nei pazienti con sarcoma. È destinato all'uso su FFPE o campioni congelati, possibilmente ottenuti da biopsie con ago.
- Le prestazioni dimostrate nel paragrafo "Caratterizzazione delle prestazioni" sono state validate secondo le istruzioni sopra descritte.

- Una piccola quantità di RNA o un campione di bassa qualità può portare a un risultato non interpretabile.

- Il sequenziamento deve essere eseguito con sequenziatori di tecnologia Illumina (Miseq e NextSeq).

Caratterizzazione delle prestazioni

Prestazioni analitiche su campioni di riferimento

Per dimostrare le prestazioni analitiche del test SarcomaFusion, ovvero la sua capacità di rilevare traslocazioni, sono stati analizzati diversi campioni di riferimento:

- 4 RNA estratti da campioni FFPE (3 positivi e 1 negativo)
- 3 RNA estratti da campioni congelati (tutti positivi)
- 2 linee cellulari (tutte negative)

I campioni positivi si riferiscono a campioni per i quali le fusioni erano note e convalidate. Questi campioni sono stati analizzati secondo la procedura descritta in queste istruzioni per l'uso e i risultati del test SarcomaFusion sono riportati nella Tabella 1.

Tabella 1: Sintesi dei risultati

Campione	Risultato atteso / raggiunto	Valori predittivi	
Campione 1	EWSR1 esone 7 - CREB1 esone 7 <i>EWSR1 esone 7 - CREB1 esone 7</i>	Vero positivo (VP)	6
Campione 2	JAZF1 esone 3 - SUZ12 esone 2 <i>JAZF1 esone 3 - SUZ12 esone 2</i>	Vero negativo (VN)	3
Campione 3	PAX3_7 esone 7 - FOXO esone 2 <i>PAX3_7 esone 7 - FOXO esone 2</i>	Valore predittivo positivo (%)	100%
Campione 4	Negativo <i>Nessuna anomalia rilevata</i>	Richiamo (%)	100%
Campione 5	SS18 esone 10 – SSX esone6 <i>SS18 esone 10 – SSX esone6</i>	Tasso di falsi positivi (%)	0%
Campione 6	PAX3_7 esone 7 – FOXO esone 2 <i>PAX3_7 esone 7 – FOXO esone 2</i>	Sensibilità (%)	100%
Campione 7	EWSR1 esone 7 – FLI1 esone 6 <i>EWSR1 esone 7 – FLI1 esone 6</i>	Falso positivo (FP)	0
Linea cellulare 1	Negativo <i>Nessuna anomalia rilevata</i>	Falso negativo (FN)	0
Linea cellulare 2	Negativo <i>Nessuna anomalia rilevata</i>	Valore predittivo negativo (%)	100%

		Precisione (%)	100%
		Tasso di falsi negativi (%)	0%
		Specificità (%)	100%

I risultati dimostrano che il test SarcomaFusion fornisce un'elevata sensibilità e specificità per il rilevamento dei trascritti di fusione associati al sarcoma.

Prestazioni analitiche su una coorte di pazienti

Uno studio pubblicato nel 2022 su 158 campioni di tumori ossei e tessuti molli (Lanic MD et al., Modern Pathology, 2022) ha dimostrato le seguenti prestazioni:

- Sensibilità = 98,1%
- Specificità = 100%

In questo articolo, gli autori riferiscono che le poche anomalie non rilevate dal test SarcomaFusion sono spiegate da:

- La presenza di traslocazioni rare o complesse non coperte dal test SarcomaFusion
- La bassa qualità e quantità di RNA da alcuni campioni

Ripetibilità

La ripetibilità del test SarcomaFusion è definita come la sua capacità di quantificare con precisione una trascrizione di fusione attesa. Sono stati effettuati due test:

- Un test per testare la ripetibilità dei risultati di 3 campioni all'interno della stessa corsa
- Un secondo per testare la ripetibilità dei risultati di 5 campioni su 3 diverse esecuzioni

Ripetibilità intra-run

Sono stati studiati 3 campioni analizzati in triplice copia dal test SarcomaFusion (Figura 1). I dati di conteggio per ogni anomalia in base alle repliche sono perfettamente confrontabili.

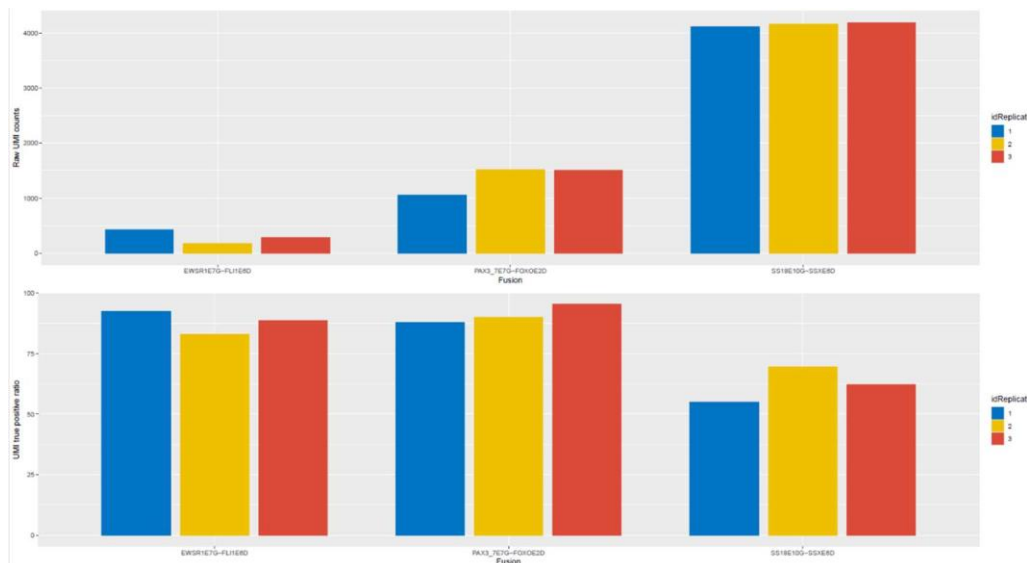


Figura 3 : Gli istogrammi rappresentano in alto il numero grezzo di UMI rilevato e in basso il numero totale di UMI nel campione in base alla fusione e alle repliche attese.

Ripetibilità inter-runs

5 campioni analizzati dal test SarcomaFusion sono stati studiati su 3 diverse esecuzioni (Figura 2). I dati di conteggio per ogni anomalia sono perfettamente comparabili.

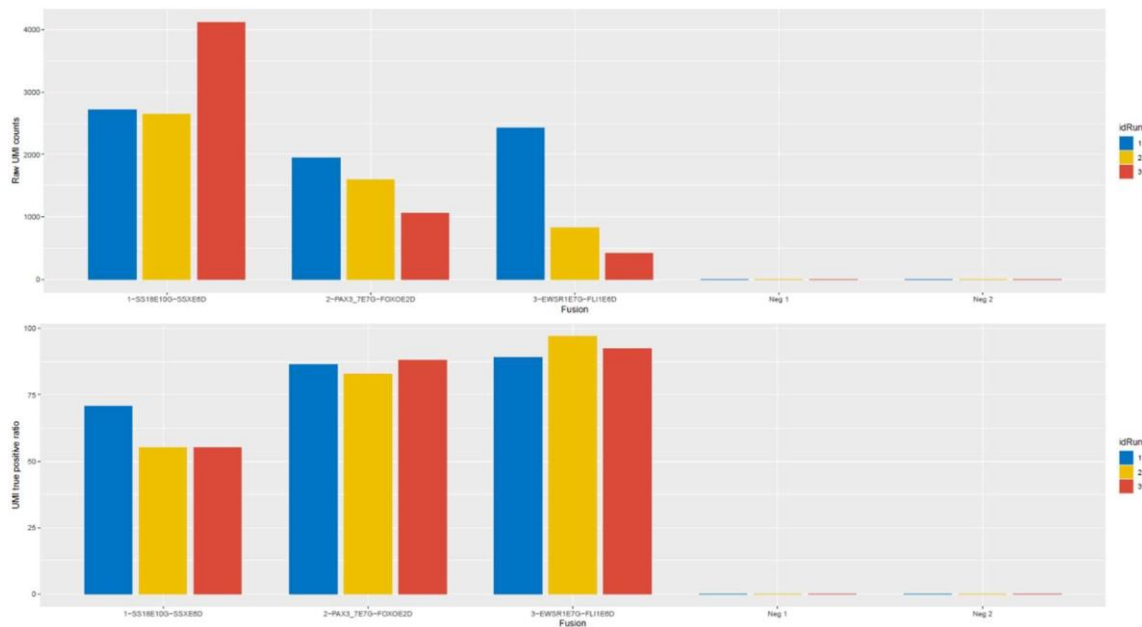


Figura 4: Gli istogrammi rappresentano in alto il numero grezzo di UMI rilevati e in basso il numero totale di UMI nel campione in base alla fusione e corsa prevista.

Riproducibilità

La riproducibilità si riferisce alla capacità del test SarcomaFusion di rilevare traslocazioni tra utenti diversi in condizioni identiche.

Per valutare questo parametro, sono stati analizzati 5 campioni da 3 diversi utenti:

- 3 campioni positivi (SS18 esone 10 – SSX esone6, PAX3_7 esone 7 – FOXO esone 2, EWSR1 esone 7 – FLI1 esone 6)
- 2 campioni negativi (linee cellulari)

I dati, mostrati nella Figura 3, mostrano una quantificazione riproducibile tra diversi utenti.

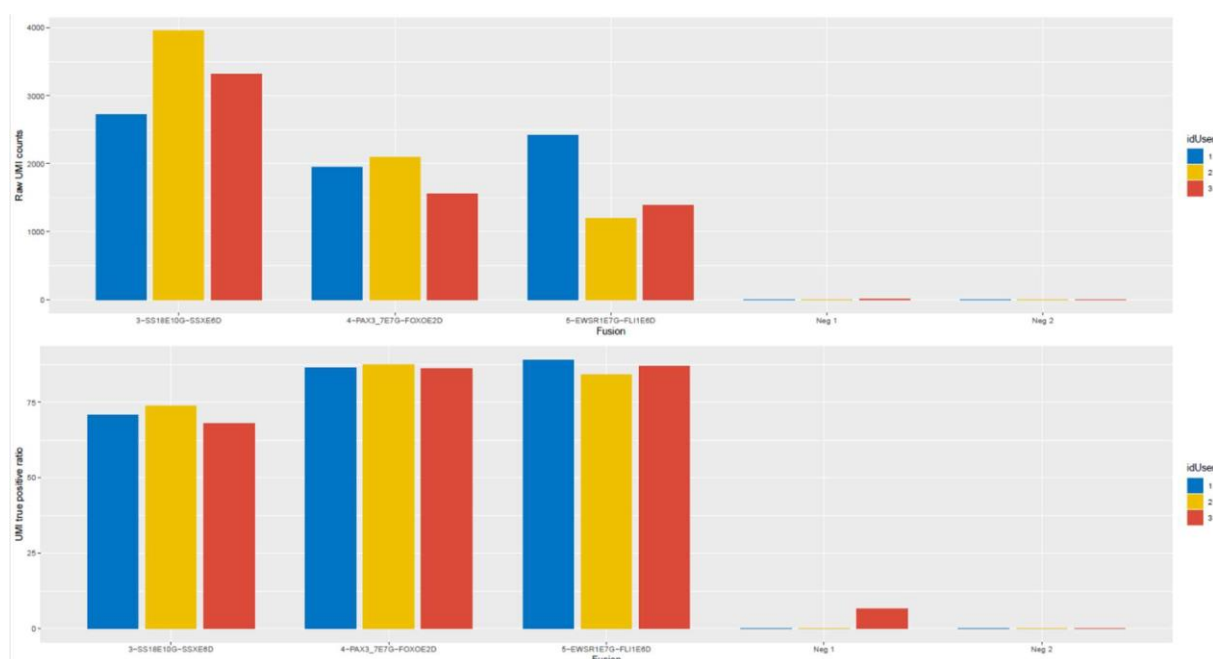


Figura 3: Gli istogrammi rappresentano in alto il numero grezzo di UMI rilevato e in basso il numero totale di UMI nel campione in base alla fusione attesa e all'utente.

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del test SarcomaFusion è definita come la sua capacità di rilevare traslocazioni in base alla quantità di RNA nel campione e alla percentuale di cellule tumorali nel campione.

Per determinare questi due limiti di sensibilità, sono state effettuate due diluizioni seriali da 2 campioni:

- Diluizione in acqua per simulare una diminuzione dell'RNA
- Una diluizione del campione da testare in RNA universale per simulare una diminuzione dell'arricchimento tumorale

I risultati sono illustrati nella Figura 4.

La diluizione di due campioni di controllo a quantità iniziali di 529 e 489 ng di RNA in nuclease free water mostra che le fusioni attese sono ancora rilevate a quantità di RNA di 4 ng. Anche se la quantificazione delle anomalie è funzione dell'arricchimento tumorale del campione testato, il limite ottenuto è ben al di sotto delle raccomandazioni per l'utilizzo del test SarcomaFusion (tra 50 e 500 ng).

La seconda gamma di diluizioni eseguite da due campioni positivi e RNA universale mostra che le anomalie attese sono sempre rilevate al 3% del campione tumorale. Allo 0% di RNA positivo, il test non rileva più alcuna traccia di fusioni.

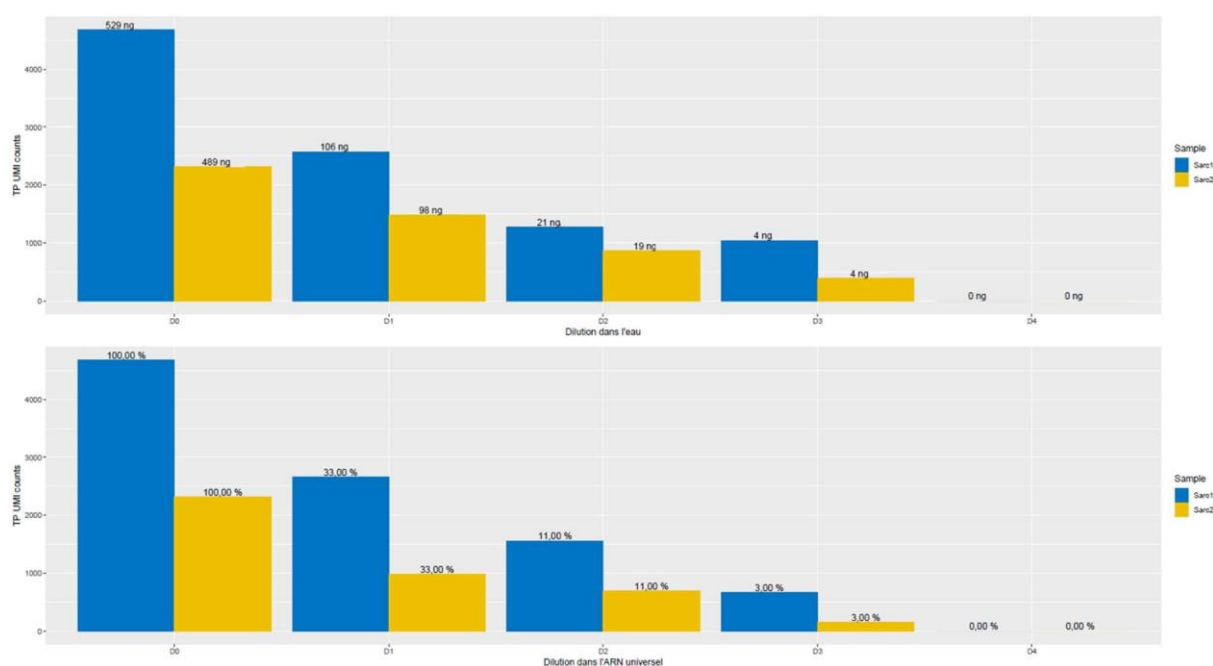











Figura 4: Gli istogrammi rappresentano il numero grezzo di UMI rilevate di fusioni attese in due campioni basati su intervalli di diluizione in acqua (in alto) o RNA universale (in basso).

Bibliografia

Rilevazione di fusioni di sarcoma mediante un test RT-PCR multiplex basato sul sequenziamento basato sulla legatura di nuova generazione. Lanic MD et al., Mod Pathol 2022 (PMID : 35075283).

Tabella dei simboli

 Fabbricante	 Nome del reagente
 Data di produzione	 limite di temperatura
 Data di scadenza	 Consultare le istruzioni per l'uso
 Codice lotto	 Marcatura CE – Conformità europea
	 Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>

Note

I reagenti **GENEXPATH SarcomaFusion** sono protetti dai diritti di proprietà intellettuale e non possono essere modificati, riprodotti, venduti o trasmessi senza l'autorizzazione del produttore.

Le informazioni contenute nel presente documento sono soggette a modifiche.