



# SarcomaFusion



## GUIA DO UTILIZADOR GENEXPATH SarcomaFusion

### Precauções para o utilizador.



Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* de acordo com a Diretiva (UE) 98/79/EC



*Para uso em diagnóstico in vitro*

É destinado apenas a uso profissional.

Leia todas as informações deste guia do utilizador antes de usar.

### Contactos:

**Fabricante:** GENEXPATH

+33 (0)2.78.08.98.69

113 avenue des Martyrs de la Résistance

76100 Rouen - França

[contact@genexpath.com](mailto:contact@genexpath.com)

[support@genexpath.com](mailto:support@genexpath.com)



INGLÊS.....	2
Precauções importantes .....	5
Recomendações gerais.....	5
Ícones.....	5
Uso pretendido.....	6
Princípio do teste .....	6
Reagentes.....	7
Conteúdo do kit de reagentes GENEXPATH SarcomaFusion .....	7
Formato dos kits de reagentes vendidos e quantidades .....	8
Reagentes não fornecidos no kit de reagentes.....	9
Equipamentos necessários .....	9
Antes de começar .....	10
Amostras biológicas .....	10
Programação dos termocicladores.....	10
Programa 1: Pré-PCR.....	10
Programa 2: PCR.....	11
Protocolo detalhado .....	11
Etapa 1: Transcrição inversa.....	11
Reagentes necessários.....	11
Transcrição reversa.....	11
Etapa 2: Hibridação das sondas .....	12
Reagentes necessários.....	12
Hibridação de sondas .....	12
Etapa 3: Ligação.....	12
Reagentes necessários.....	12
Ligação .....	13
Etapa 4: Amplificação e incorporação de códigos de barras e adaptadores.....	13
Reagentes necessários.....	14
Amplificação .....	14
Etapa 5: Purificação e ensaio das bibliotecas de sequenciamento .....	14
Reagentes necessários.....	15
Etapa 5.a: Purificação das bibliotecas de sequenciamento .....	15
Etapa 5.b: Ensaio das bibliotecas de sequenciamento .....	15

Etapa 6: Diluição, agrupamento e sequenciação de bibliotecas .....	15
Reagentes necessários.....	15
Sequenciação num sequenciador Illumina MiSeq.....	15
• Etapa 6.a: Diluição e agrupamento de bibliotecas.....	16
• Etapa 6.b: Desnaturação e diluição do pool de bibliotecas.....	16
• Etapa 6.c: Preparação dos primers de sequenciação.....	16
• Etapa 6.d: Preparação da folha de injeção .....	16
• Etapa 6.e: Início da sequenciação.....	17
Sequenciação numa plataforma Illumina NextSeq 500/550.....	17
• Etapa 6.a: Diluição e agrupamento de bibliotecas.....	17
• Etapa 6.b: Desnaturação e diluição do pool de bibliotecas .....	17
• Etapa 6.c: Preparação dos primers de sequenciação.....	17
• Etapa 6.d: Preparação da folha de injeção .....	18
• Etapa 6.e: Início da sequenciação .....	18
Etapa 7: Análise dos resultados .....	18
Limites do procedimento.....	19
Caracterização dos desempenhos .....	19
Desempenho analítico em amostras de referência .....	19
Quadro 1: Resumo dos resultados .....	19
Desempenhos analíticos numa coorte de doentes .....	20
Capacidade de repetição .....	20
Repetibilidade intra-corrida .....	21
Repetibilidade entre execuções.....	21
Reprodutibilidade.....	22
Sensibilidade analítica .....	22
Bibliografia .....	23
Tabela de símbolos .....	24
Notas.....	24

## Precauções importantes.

### Recomendações gerais.

- Utilizável para utilização *em diagnóstico in vitro*
- Seguir as melhores práticas laboratoriais em termos de manuseamento de produtos PCR (usar batas e luvas descartáveis, marcar zonas dedicadas para pré e pós-PCR, utilizar pontas de filtro).
- Tomar também precauções para evitar a contaminação por nuclease suscetível de causar a degradação do ARN e do ADN (utilizar reagentes e consumíveis isentos de nucleases).
- Assegurar que os termocicladores estão em condições de funcionamento e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.
- É particularmente importante não substituir reagentes não incluídos no kit, em especial tampões e enzimas utilizados durante os passos de transcrição reversa, ligação e amplificação da PCR. As temperaturas e os tempos de incubação, bem como os volumes e as concentrações, também devem ser respeitados.
- O kit de teste **SarcomaFusion** contém um controlo interno positivo GAPDH. Recomenda-se vivamente que o complete para verificar se a sua experiência foi realizada corretamente.
- Os reagentes **GENEXPATH SarcomaFusion** destinam-se apenas a ser utilizados com as plataformas de sequenciação MiSeq ou NextSeq 500/550 da Illumina.
- As fichas de dados de segurança estão disponíveis no espaço do utilizador.
- Se o utilizador detetar erros no manual de instruções: por favor envie nos um email para [contact@genexpath.com](mailto:contact@genexpath.com)
- Qualquer incidente grave relacionado com o dispositivo deve ser-nos comunicado através do endereço [contact@genexpath.com](mailto:contact@genexpath.com).

## Ícones



Pontos importantes e passos críticos do protocolo que podem comprometer a qualidade dos resultados.



Etapas em que o protocolo pode ser suspenso.

## Uso pretendido

Este protocolo destina-se ao teste **GENEXPATH SarcomaFusion**. É utilizado para preparar bibliotecas de sequenciação para os sequenciadores MiSeq ou NextSeq 500/550 da Illumina.

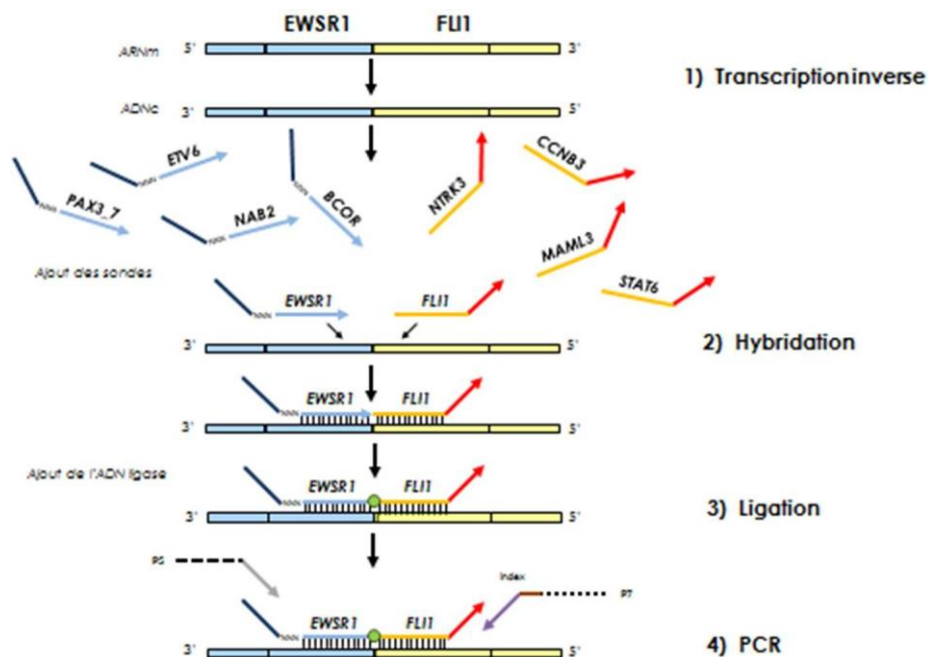
Os ficheiros fastQ gerados com este teste contêm dados sobre a contagem de sequências correspondentes à presença potencial de um transcrito de fusão, ou seja, a ligação de duas sondas e a sua amplificação.

Podem ser analisadas com o software **GENEXPATH RT-MIS**, que contém uma aplicação específica de desmultiplexagem de sequências.

Ao estudar 138 genes, este teste pode detetar transcrições de fusão encontradas em 58 tipos de tumores ósseos e de tecidos moles.

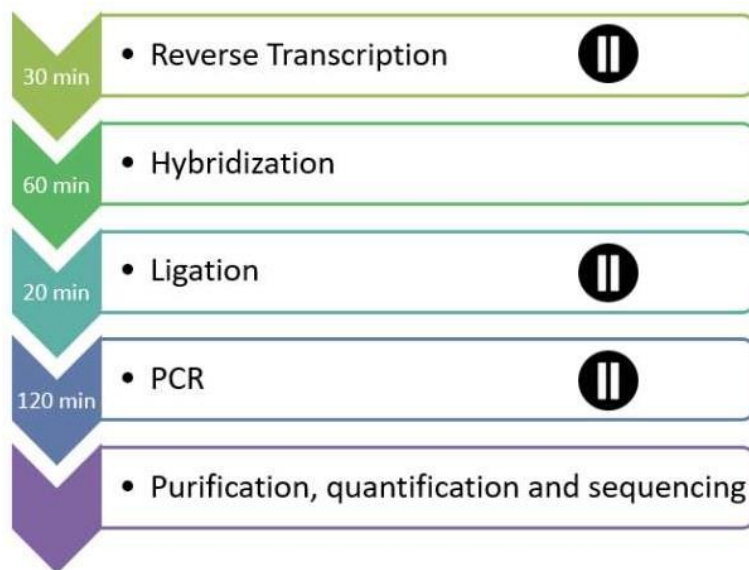
### Princípio do teste

O teste **GENEXPATH SarcomaFusion** utiliza um método de RT-PCR dependente de ligação (LD-RT-PCR). Esta técnica semi-quantitativa ajuda a detetar traduções cromossómicas utilizando pares específicos de sondas de oligonucleótidos. Está incluído um par de sondas para um gene de controlo (GAPDH) na mistura de sondas do teste, permitindo um controlo interno da sua experiência.



Quatro passos são suficientes para obter bibliotecas a partir de uma extração total de ARN.

- Uma passo de transcrição reversa (RT).
- Uma passo de hibridação de sondas de oligonucleótidos específicos.
- Uma passo de ligação.
- Uma passo de amplificação por PCR.



Não é necessária qualquer purificação até à obtenção das bibliotecas, o que limita as perdas de material e garante uma excelente sensibilidade desta técnica. Além disso, as sequências de genes visadas pelas sondas são particularmente curtas (entre 40 e 60 bases), o que garante uma excelente robustez no que respeita à degradação do ARN.

A LD-RT-PCR é, por conseguinte, uma abordagem particularmente adequada para a análise de amostras biológicas difíceis, como biópsias de tecidos fixadas e incluídas em parafina.

Para cada amostra, cerca de  $10^5$  sequências são suficientes para obter um perfil de expressão analisável, o que ajuda a testar um grande número de amostras simultaneamente na mesma célula de sequenciação. As bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** também podem ser carregadas ao mesmo tempo que outras bibliotecas de sequenciação, geradas por outros métodos.

## Reagentes.

### Conteúdo do reagente *GENEXPATH SarcomaFusion kit*.

Mistura de sondas **GENEXPATH SarcomaFusion (probe mix)** GEP-SFPM

Códigos de barras **GENEXPATH SarcomaFusion (barcodes)** GEP-BC-xxx

Primer de sequenciação **GENEXPATH SarcomaFusion (sequencing primer)** GEP-SP-001

**GENEXPATH SarcomaFusion** códigos de barras/barcodes GAPDH GEP-BCC-xxx

**GENEXPATH SarcomaFusion** Primer de sequenciação/ sequencing primer GAPDH

GEP-SP-002 XXX: número de código de barras

Após a receção, estes reagentes devem ser armazenados entre -25°C e -15°C.

Estão prontos a utilizar e não necessitam de ser diluídos.

O prazo de validade dos reagentes é de 1 ano.

Devolver às condições de armazenamento imediatamente após a utilização.

Não utilizar os reagentes após o prazo de validade indicado no rótulo.

**Formato dos kits de reagentes vendidos e quantidades:**

	Kit de reagentes - U= número de análises			
	8U	16U	24U	48U
Mistura de sondas <b>GEP-SFPM</b>	30 µL	48 µl	54 µl	108 µL
Códigos de barras <b>GEP-BC-xxx (de 001 a 032, consoante o número de análises adquiridas)</b> BC=código de barras	8 BC	8 BC	12 BC	24 A.C.
	N°017 a 024	N°001 a 008	N°021 a 032	N°001 a 024
	5 µL/BC	9 µL/BC	9 µL/BC	9 µL/BC
Primers de sequenciação <b>GEP-SP-001</b>	60 µL	96 µL	144 µL	288 µL
<b>Para o controlo interno</b>				
Códigos de barras <b>GAPDH GEP-BCC-xxx (de 001 a 032, consoante o número de análises adquiridas)</b> BCC=código de barras de controlo	8 BCC	8 BCC	12 BCC	24 BCC
	N°017 a 024	N°001 a 008	N°021 a 032	N°001 a 024
	5 µL/BCC	9 µL/BCC	9 µL/BCC	9 µL/BCC
Primers de sequenciação GAPDH <b>GEP-SP-002</b>	60 µL	96 µL	144 µL	288 µL

Os reagentes são fornecidos em quantidades superiores às efetivamente necessárias. Após a realização do número de análises encomendadas, devem ser deitados fora. Se for efectuada uma nova encomenda, serão fornecidos novos reagentes.

Para um kit de reagentes com mais de 8 análises, cada código de barras será utilizado para 2 análises diferentes.



Reagentes não fornecidos no kit de reagentes :

<b>Reagentes</b>	<b>Fornecedores e referências</b>
Kit de síntese de cDNA SuperScript™ VILO™	Invitrogen, ref. 11754250
Tampão SALSA MLPA	MRC Holland, ref. SMR33
Tampão A da ligase SALSA	MRC Holland, ref. SMR12
Tampão B da ligase SALSA	MRC Holland, ref. SMR13
SALSA Ligase 65	MRC Holland, ref. SMR20
Mistura PCR Red'y' Star	Eurogentec, ref. PK-0073-02R
AMPure XP (esferas magnéticas)	Beckman Coulter, ref A63880
Ensaio Qubit® dsDNA HS	Fisher Scientific, ref. 10616763
Reagentes de sequenciação	Illumina
Tampão TE (10 mM Tris-Acetato pH 8,0, 1 mM EDTA)	Variável
Etanol 100%	Variável
NaOH 1 N	Variável
Tampão Tris 200 mM pH 7	Variável
Água sem nuclease	Variável

Aquando da receção e entre cada utilização, estes reagentes devem ser armazenados com base nas recomendações do fornecedor.

**Necessário equipamento:**

<b>Equipamentos</b>	<b>Fornecedores e referências</b>
Termociclador na zona de pré-PCR	Variável
Termociclador na zona pós-PCR	Variável
Fluorómetro Qubit® (ou equivalente)	Thermo Fisher Scientific, ref. Q33238
Tubos de ensaio Qubit	Fisher Scientific, ref. 12037609
Íman lateral DynaMag™-96 - Placa magnética (purificação AMPure XP)	Thermo Fisher Scientific, ref. 12331D
Placas e tubos PCR 200 µL	Variável

## Antes de começar.

### *Amostras biológicas*

O teste **GENEXPATH SarcomaFusion** é utilizado para preparar bibliotecas de sequenciação utilizando extracções de ARN total de biópsias ou tecidos de tumores de sarcoma (tumores ósseos e de tecidos moles).

Estas amostras podem ser frescas, congeladas ou fixadas em formalina e incluídas em parafina (FFPE).

Para extrair o ARN de tecidos fixados, recomendamos a utilização do kit Promega Maxwell® RSC RNA FFPE (Promega, ref. AS1440 e AS4500).

A quantidade de ARN a analisar deve situar-se **entre 50 e 500 ng, volume de 2 µL**. Se a concentração das soluções a analisar for demasiado elevada, este ARN pode ser diluído em água sem nuclease.

### *Programação dos termocicladores*

Para limitar os riscos de contaminação, utilizar dois termocicladores, um na zona pré-PCR e outro na zona pós-PCR.

São necessários dois programas:

- A primeira destina-se às três primeiras etapas do protocolo: **transcrição reversa do ARN para cADN, hibridação das sondas de oligonucleótidos e ligação**. Deve ser executado no termociclador localizado na zona de pré-PCR.
- A segunda é utilizada para amplificar os produtos de ligação e incorporar os códigos de barras e adaptadores necessários para a sequenciação. Deve ser efectuada no termociclador situado na zona pós-PCR.

### **Programa 1: Pré- PCR.**



*Como os volumes de reacção são pequenos, por favor assegure-se que a temperatura da tampa aquecida do termociclador se mantém elevada (95°C) em todas as etapas do programa para evitar a evaporação.*

São previstas pausas a 4°C ou 54°C entre os diferentes passos do programa para adicionar os reagentes necessários.

#### ***Etapa 1: Transcrição inversa do ARN para cADN.***

- Tampa aquecida: 95°C
- 10 minutos 25°C
- 60 minutos a 42°C
- 5 minutos 85°C
- 4°C infinito

**Etapa 2: Hibridação das sondas.**

- Tampa aquecida: 95°C
- 2 minutos 95°C
- 60°C infinito (1 hora de hibridação)

**Etapa 3: Ligação.**

- Tampa aquecida: 95°C
- 54°C infinito (distribuição da mistura de ligação)
- 15 minutos 54°C
- 5 minutos 98°C
- 4°C infinito

**Programa 2: PCR.**

- Tampa aquecida: 95°C
- 6 minutos 94°C
- 35 x (30 segundos 94°C; 30 segundos 58°C; 30 segundos 72°C)
- 4 minutos 72°C
- 4°C infinito

**Protocolo pormenorizado.****Passo 1: Transcrição reversa .**

Este passo deve ser efectuado zona pré-PCR.

**Reagentes necessários.**

- Mistura de reação Vilo 5X, super script 10X (SuperScript Vilo cDNA Synthesis Kit), água sem nuclease, extração de ARN total para testar (25 a 250 ng/μL).



*Recomenda-se a realização de todo o procedimento em placas ou tubos PCR de 200 μL.*

**Transcrição reversa .**

- Descongelar os seguintes reagentes e mantê-los em gelo ou numa grelha de arrefecimento: Mistura de reação Vilo 5X e super script 10X.
- Preparar uma mistura de transcrição reversa. Para cada amostra, misturar (para um volume total de 3 μL por reação):
  - Mistura de reação Vilo 5X 1 μL
  - Água sem nuclease 1 μL
  - 10X super script 0,5 μL
- Distribuir esta mistura em tubos PCR de 200 μL (2,5 μL por tubo) mantidos em gelo ou numa grelha de arrefecimento:
- Adicionar 2,5 μL de cada uma das soluções de ARN total diferentes tubos.

- Agitar em vórtice e centrifugar brevemente.
- Colocar os tubos no termociclador na zona de pré-PCR e passar ao **passo 1 do programa Pre-PCR** (Transcrição reversa do ARN para cADN).



**Em seguida, avançar diretamente para o passo 2, ou manter os produtos de ligação entre -25°C e -15°C.**

### *Passo 2: Hibridação das sondas .*

Este passo deve ser efectuado zona pré-PCR.

#### **Reagentes necessários.**

- **GENEXPATH SarcomaFusion** probe mix (GEP-SFPM), Tampão SALSA MLPA.

#### **Hibridação de sondas .**

- **No final do passo 1**, quando a temperatura do termociclador tiver descido para 4°C, retire os tubos, centrifugue-os brevemente e coloque-os em gelo ou numa grelha de arrefecimento.
- Descongelar o tampão Salsa MLPA e a mistura de sondas **GENEXPATH SarcomaFusion** e, em seguida, mantê-los em gelo ou numa grelha de arrefecimento.
- Preparar uma mistura de hibridação. Para cada amostra, misturar (para um volume total de 3 µL por reacção):
  - o Tampão Salsa MLPA 1,5 µL
  - o Mistura de sondas **GENEXPATH SarcomaFusion** 1,5 µL
- Agitar em vórtice e centrifugar brevemente.
- Adicionar 3 µL desta mistura a cada tubo de cDNA.
- Centrifugar brevemente.
- Voltar a colocar os tubos no termociclador.
- Verificar a temperatura da tampa aquecida (95°C).
- Avançar para o **passo 2 do programa pré-PCR** (hibridação das sondas).

### *Passo 3: Ligation.*

Este passo deve ser efectuado zona pré-PCR.

#### **Reagentes necessários.**

- Tampão SALSA Ligase A, Tampão SALSA Ligase B, SALSA Ligase 65, água sem nuclease.

### Ligação.

- 15 minutos antes do final da etapa 2, descongelar o tampão SALSA Ligase A e o tampão SALSA Ligase B e mantê-los em gelo ou numa grelha de arrefecimento.
- Colocar a enzima Salsa Ligase 65 em gelo ou numa grelha de arrefecimento.
- Preparar uma mistura de ligação. Para cada amostra, misturar (para um volume total de 32 µL por reação):
  - o Água sem nuclease 25 µL
  - o Tampão A da Salsa Ligase 3 µL
  - o Tampão B da Salsa Ligase 3 µL
- Agitar em vortex e, centrifugar brevemente
  - o Salsa Ligase 65 1 µL
- Agitar em vórtice e centrifugar brevemente.
- Após 60 minutos de incubação, passar ao **passo 3 do programa pré-PCR (ligação)**.
- Baixar a temperatura do bloco aquecido para 54°C.
- Adicionar 32 µL da mistura de ligação diretamente a cada tubo, sem os retirar do bloco aquecido.
- Depois de distribuir a mistura, passar à etapa seguinte do programa (15 minutos a 54°C, 5 minutos a 98°C).



**No final deste passo, quando a temperatura do bloco de PCR baixar para 4°C, passar imediatamente ao passo 4 (amplificação por PCR) ou congelar os produtos de ligação (entre -25°C e -15°C).**



**Após este passo, não manter os produtos a temperaturas mais elevadas (por exemplo, 4°C ou temperatura ambiente) para evitar ligações não específicas que possam resultar da atividade enzimática residual.**

### *Passo 4: Amplificação e incorporação de códigos de barras e adaptadores .*

Nesta fase, os produtos de ligação são amplificados por PCR graças às caudas adicionais na extremidade das sondas. Estas amplificações são efectuadas com pares de primers fornecidos nos tubos de código de barras **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BC-xxx).

Para permitir a análise de várias amostras na mesma célula de fluxo, o iniciador 3' da PCR tem um código de barras molecular que será reconhecido pelo algoritmo de desmultiplexagem da plataforma **GENEXPATH RT-MIS**.

Para realizar o controlo interno com sondas GAPDH, são completadas duas reacções de PCR diferentes, pelo que é necessário duplicar o número de tubos. Para cada determinada amostra, é necessário utilizar o mesmo número de código de barras GEP-BC-xxx e GEP-BCC-xxx para a análise das informações. Assim, é necessário adicionar, para cada amostra, num tubo o código de barras GEP-BC-xxx e no outro o código de barras associado GEP-BCC-xxx.

### Reagentes necessários.

- Códigos de barras **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BC-xxx), Códigos de barras GAPDH **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BCC-xxx), Red'y' Star PCR Mix, água sem nuclease.

### Amplificação.

- Preparar uma mistura de amplificação na zona pré-PCR. Para cada amostra, misturar (para um volume total de 18 µL por reacção):
  - o Mistura PCR Red'y' Star 12,5 µL
  - o Água sem nuclease 5,5 µL
- Agitar em vórtice e centrifugar brevemente.
- Distribuir 18 µL da mistura de amplificação nos diferentes poços da placa PCR.
- Adicionar 5 µL de produtos de ligação gerados no passo 3 a cada um dos poços.
- Adicionar 2 µL dose código de barras **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BC-xxx ou GEP-BCC-xxx, consoante o teste).



*Utilizar códigos de barras GEP-BC-xxx diferentes para cada amostra testada, mas para a mesma amostra, utilizar o mesmo número para GEP-BC-xxx e GEP-BCC-xxx.*

- Colocar a placa no termociclador na zona pós-PCR.
- Iniciar o **programa 2** (PCR).



**No final do programa, quando a temperatura do termociclador baixar para 4°C, passar rapidamente para o passo 5 (purificação) ou congelar os produtos de amplificação entre -25°C e -15°C.**



**Não manter estes produtos a temperaturas mais elevadas durante um longo período de tempo (por exemplo, 4°C no termociclador ou à temperatura ambiente).**

### Passo 5: Purificação e ensaio de sequenciação de bibliotecas.

No final do passo de amplificação, as bibliotecas de sequenciação devem ser purificadas para eliminar os primers de PCR e os nucleótidos não incorporados. Esta purificação utiliza esferas magnéticas AMPure XP. As bibliotecas devem ser testadas por fluorimetria com o kit Qubit® dsDNA HS antes de serem carregadas no sequenciador.

### Reagentes necessários.

- Etanol a 100%, água sem nuclease, esferas AMPure XP, tampão TE (10 mM Tris-Acetato pH 8,0, 1 mM EDTA), Qubit® dsDNA HS Assay.

### Passo 5.a: Purificação das bibliotecas de sequenciação.



**Assegurar que as esferas são completamente ressuspensas antes da utilização.**

- Purificar 25 µL dos produtos de PCR com 45 µL de esferas AMPure XP (seguindo as recomendações do fabricante).
- Eluir os produtos de PCR purificados em 50 µL de tampão TE.



**Após a purificação, as bibliotecas podem ser armazenadas entre -25°C e -15°C antes da sequenciação.**

### Passo 5.b: Ensaio de sequenciação das bibliotecas.

- Efetuar o ensaio de 10 µL de cada biblioteca de sequências a través de fluorimetria utilizando o kit Qubit® dsDNA HS Assay.

### Passo 6: Diluição, junção (pooling) e sequenciação das bibliotecas .

Após a purificação, as bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** devem ser diluídas, combinadas e carregadas no sequenciador.



**Para obter resultados óptimos, deve ser lido um mínimo de 10<sup>5</sup> sequências para cada amostra.**

Ao contrário da maioria das bibliotecas de sequenciação clássicas, a leitura dos códigos de barras moleculares necessários para a desmultiplexagem das sequências **GENEXPATH SarcomaFusion** ocorre durante a leitura<sup>1</sup>. Estas sequências não são desmultiplexadas automaticamente pelo sequenciador e serão guardadas em ficheiros fastQ "Undetermined" (indeterminados). A desmultiplexagem é efectuada utilizando o algoritmo específico fornecido na plataforma **GENEXPATH RT-MIS**.

### Reagentes necessários.

- Primer de sequenciação **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001), primers de sequenciação de controlo **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-002) (se o controlo interno estiver concluído), reagentes de sequenciação Illumina.

### Sequenciação num sequenciador Illumina MiSeq .

Para obter informações pormenorizadas sobre a diluição e a desnaturação das bibliotecas, a preparação do iniciador de sequenciação, a folha de injeção e o início da sequenciação, por favor consulte o guia da Illumina para o sistema MiSeq.

- **Passo 6.a: Diluição e junção (pooling) das bibliotecas .**

- Diluir cada biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion** numa concentração entre 2 nM e 4 nM, considerando um tamanho médio de fragmento amplificado de 150 pb.
- Agrupar as bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** no volume equivalente.
- Se forem sequenciadas outras bibliotecas na mesma FlowCell, ajustar as concentrações dos diferentes pools e depois combiná-los para obter os números de sequência desejados (mínimo de  $10^5$  seqüências para cada biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion**).

Exemplo: Para um pool de 10 bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** que requerem 1 M de seqüências ( $10^5$  seqüências para cada uma das 10 bibliotecas), sequenciadas com um pool de bibliotecas B com a mesma concentração e que requerem 3 M de seqüências, misturar 1  $\mu$ L do pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** e 3  $\mu$ L do pool de bibliotecas B.

- **Passo 6.b: Desnaturação e diluição do pool das bibliotecas.**

- Desnaturar e diluir o pool final com base nas recomendações do guia Illumina para o sistema MiSeq, para obter uma concentração de carregamento final de 8 a 10 pM.

- **Passo 6.c: Preparação dos primers de sequenciação.**

- Se o pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** for sequenciado sozinho, diluir 3  $\mu$ L de cada primer de sequenciação **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 e GEP-SP-002, se for o controlo interno) num volume final de 600  $\mu$ L de tampão HT1 e, em seguida, colocar estes 600  $\mu$ L no poço 18 do cartucho de reagentes MiSeq.
- Se o pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** for carregado com outras bibliotecas sequenciadas com primers de sequenciação Illumina, pipetar todo o conteúdo do poço 12 (cerca de 600  $\mu$ L), adicionar 3  $\mu$ L de cada primer de sequenciação **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 e GEP-SP-002 se for o controlo interno) e colocar esta mistura no poço 18 do cartucho.

- **Passo 6.d: Preparação da folha de injeção .**

- Se a biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion** for sequenciada sozinha, criar a folha de injeção para gerar ficheiros FASTQ com 120 ciclos na leitura 1.
- Se as bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** forem combinadas com outras bibliotecas de sequenciação, gerar a folha de injeção utilizando os parâmetros habituais, sem introduzir as amostras **GENEXPATH SarcomaFusion**.
- Especificar a utilização de setup personalizado durante a configuração da corrida (com o Local Run Manager na página Criar corrida / Create Run. No modo de corrida manual, no ecrã Configuração de Corrida /Run Setup).



*Em todos os casos, assegurar que a leitura 1 é efectuada com um mínimo de 120 ciclos e que a caixa Custom Primer for Read 1 está assinalada.*



- Em todos os casos, as sequências da biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion** não serão desmultiplexadas pelo sequenciador, mas serão guardadas num ficheiro FastQ "Undetermined", que será depois carregado na plataforma **GENEXPATH RT-MIS**.
- **Passo 6.e: Início da sequenciação .**
- Iniciar a sequenciação seguindo o procedimento descrito no guia da Illumina para o sistema MiSeq.

### Sequenciação numa plataforma Illumina NextSeq 500/550 .

Para obter informações pormenorizadas sobre a diluição e a desnaturação das bibliotecas, a preparação do iniciador de sequenciação, a folha de injeção e o início da sequenciação, consulte o guia Illumina para o sistema NextSeq.

- **Passo 6.a: Diluição e junção (pooling) das bibliotecas .**
- Diluir cada biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion** numa concentração entre 0,5 nM e 4 nM, considerando um tamanho médio de fragmento amplificado de 150 pb.
- Agrupar as bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** no volume equivalente.
- Se forem sequenciadas outras bibliotecas na mesma FlowCell, ajustar as concentrações dos diferentes pools e depois combiná-los para obter os números de sequência desejados (mínimo de  $10^5$  sequências para cada biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion**).

Exemplo: Para um conjunto de 10 bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** que requerem 1 M de sequências ( $10^5$  sequências para cada uma das 10 bibliotecas), sequenciadas com um conjunto de bibliotecas B com a mesma concentração e que requerem 3 M de sequências, misturar 1  $\mu$ L do conjunto de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** e 3  $\mu$ L do conjunto de bibliotecas B.

- **Passo 6.b: Desnaturação e diluição do pool das bibliotecas.**
- Desnaturar e diluir o pool final com base nas recomendações do guia Illumina para o sistema NextSeq, para obter uma concentração de carregamento final de 0,8 pM a 1 pM.
- **Passo 6.c: Preparação dos primers da sequenciação.**
- Se o pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** for sequenciado sozinho, dilua 6  $\mu$ L de cada primer de sequenciação **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 e GEP-SP002, se for controlo interno) num volume final de 2000  $\mu$ L de tampão HT1 e, em seguida, colocar estes 2 mL no poço 7 do cartucho de reagentes MiSeq.
- Se o pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** for combinado com outras bibliotecas sequenciadas com primers de sequenciação Illumina, pipete todo o conteúdo do poço 20 (cerca de 2 ml), adicionar 6  $\mu$ L de cada primer de sequenciação **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP- SP-001 e GEP-SP-002 se for controlo interno) e colocar esta mistura no poço 7 do cartucho.

- **Passo 6.d: Preparação da folha de injeção .**

- Se a biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion** for sequenciada sozinha, criar a folha de injeção para gerar ficheiros FASTQ com 120 ciclos na leitura 1.
- Se as bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** forem combinadas com outras bibliotecas de sequenciação, gerar a folha de injeção utilizando os parâmetros habituais, sem introduzir as amostras **GENEXPATH SarcomaFusion**.
- Especificar a utilização de personalização durante a configuração da corrida/run setup (com o Local Run Manager na página Criar Corrida / Create Run. No modo de corrida manual, no ecrã Configuração de Corrida / Create Run).



*Em todos os casos, assegurar que a leitura 1 é efectuada com um mínimo de 120 ciclos e que a caixa Custom Primer for Read 1 está assinalada.*

- Em todos os casos, as sequências da biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion** não serão desmultiplexadas pelo sequenciador, mas serão guardadas no ficheiro FastQ "Undetermined" (indeterminado), que deverá então ser carregado na plataforma **GENEXPATH RT-MIS**.

- **Passo 6.e: Início da sequenciação .**

- Iniciar a sequenciação seguindo o procedimento descrito no guia da Illumina para o sistema NextSeq.

### **Passo 7: Análise de Resultados.**

Os ficheiros de sequências gerados pela plataforma de sequenciação Illumina (MiSeq ou NextSeq) no formato FastQ devem ser analisados utilizando o software **GENEXPATH RT-MIS** disponível no seguinte endereço: <https://connect.genexpath.com/>.



*Para ajudar a descarregar o ficheiro FastQ, este não deve ser descomprimido (fastq.gz).*

Este software é uma solução bioinformática completa que inclui diferentes algoritmos de processamento de dados. Efectua a desmultiplexagem para atribuir sequências a cada amostra. Em seguida, identifica com precisão os marcadores de expressão genética e quantifica-os.

O software **GENEXPATH SarcomaFusion** baseia-se na quantificação de marcadores qualitativos que caracterizam a presença ou ausência de translocações cromossómicas.

O software **GENEXPATH RT-MIS** gera relatórios concisos e transparentes, desde a implementação de reacções de sequenciação até à análise automática dos resultados da sequenciação.

O software **GENEXPATH RT-MIS** requer que os ficheiros de sequenciação sejam carregados no formato FASTQ, bem como a lista de códigos de barras utilizados durante o teste.

O **GENEXPATH RT-MIS** avalia a qualidade da sequenciação de cada amostra através da quantificação do número de leituras identificadas e do número de UMI (identificadores moleculares únicos) detectados.

Para cada amostra, o **GENEXPATH RT-MIS** gera um relatório de análise indicando a presença ou ausência de um transcrito de fusão, o número de leituras e UMI obtidos, bem como uma referência bibliográfica correspondente ao transcrito (se tiver sido detectada uma fusão). Estes dados podem ser descarregados.

O **GENEXPATH RT-MIS** inclui um guia do utilizador acessível diretamente online para explicar como utilizar a ferramenta, descrever todos os resultados gerados e explicar a apresentação dos resultados.

A empresa **GENEXPATH** não armazena permanentemente os resultados gerados pelo software **GENEXPATH RT-MIS**. Os dados devem ser descarregados diretamente após cada análise e guardados pelo utilizador no seu sistema de gestão de documentos.

## Limites do procedimento

- O teste SarcomaFusion foi desenvolvido com base em dados da literatura para detetar as transcrições de fusão mais frequentes em doentes com sarcoma. Destina-se a ser utilizado em amostras FFPE ou congeladas, possivelmente obtidas a partir de biópsias por agulha.
- O desempenho demonstrado no parágrafo "Caracterização do desempenho" foi validado de acordo com as instruções acima indicadas.
- Uma quantidade reduzida de ARN ou uma amostra de baixa qualidade pode causar um resultado não interpretável.
- A sequenciação deve ser efectuada com sequenciadores de tecnologia Illumina (Miseq e NextSeq).

## Caracterização dos desempenhos

### Desempenho analítico em amostras de referência

Para demonstrar o desempenho analítico do teste SarcomaFusion, ou seja, a sua capacidade para detetar translocações, foram analisadas várias amostras de referência:

- 4 ARNs extraídos de amostras FFPE (3 positivos e 1 negativo)
- 3 ARNs extraídos de amostras congeladas (todos positivos)
- 2 linhas celulares (todas negativas)

As amostras positivas referem-se a amostras para as quais as fusões eram conhecidas e validadas. Estas amostras foram analisadas de acordo com o procedimento descrito no presente manual de instruções e os resultados do teste SarcomaFusion são apresentados no Quadro 1.

### Quadro 1: Resumo dos resultados do sítio

amostras	resultado esperado / <i>obtido</i>	valor preditivo	
amostra 1	Exão 7 do EWSR1 - Exão 7 do CREB1 <i>Exão 7 do EWSR1 - Exão 7 do CREB1</i>	Positivo verdadeiro	6
amostra 2	JAZF1 exão 3 - SUZ12 exão 2	Negativo verdadeiro	3

	<i>JAZF1 exão 3 - SUZ12 exão 2</i>		
<b>amostra 3</b>	PAX3_7 exão 7 - FOXO exão 2 <i>PAX3_7 exão 7 - FOXO exão 2</i>	Positivo Valor previsto	100%
<b>amostra 4</b>	Negativo <i>não foi detectada fusão</i>	Recall	100%
<b>amostra 5</b>	SS18 exão 10 - SSX exão6 <i>SS18 exão 10 - SSX exão6</i>	Taxa de falsos positivos	0%
<b>amostra 6</b>	PAX3_7 exão 7 - FOXO exão 2 <i>PAX3_7 exão 7 - FOXO exão 2</i>	Sensibilidade	100%
<b>amostra 7</b>	Exão 7 do EWSR1 - exão 6 do FLI1 <i>Exão 7 do EWSR1 - exão 6 do FLI1</i>	Falso positivo	0
<b>linha celular 1</b>	Negativo <i>Não foi detectada fusão</i>	Falso negativo	0
<b>linha celular 2</b>	Negativo <i>não foi detectada fusão</i>	Valor previsto negativo	100%
		Exatidão	100%
		Taxa de falsos negativos	0%
		Especificidade	100%

Os resultados demonstram que o teste SarcomaFusion proporciona uma elevada sensibilidade e especificidade para a deteção de transcrições de fusão em sarcomas.

### **Desempenhos analíticos numa coorte de pacientes**

Um estudo publicado em 2022 sobre 158 amostras de tumores ósseos e de tecidos moles (Lanic MD et al., Modern Pathology, 2022) demonstrou o seguinte desempenho:

Sensibilidade= 98,1%

Especificidade= 100%

Neste artigo, os autores referem que as poucas anomalias não detectadas pelo teste SarcomaFusion são explicadas por:

- A presença de translocações raras ou complexas não abrangidas pelo teste SarcomaFusion
- A baixa qualidade e quantidade de ARN de algumas amostras

### **Repetibilidade**

A repetibilidade do ensaio SarcomaFusion é definida como a sua capacidade de quantificar com exatidão um transcrito de fusão esperado. Foram efectuados dois corridas:

- Um teste para testar a repetibilidade dos resultados de 3 amostras na mesma execução
- Um segundo teste que permite testar a repetibilidade dos resultados de 5 amostras em 3 corridas diferentes

### Repetibilidade intra- corrida

Foram estudadas 3 amostras analisadas em triplicado pelo teste SarcomaFusion (Figura 1). Os dados de contagem de cada fusão em relação às réplicas são totalmente comparáveis.

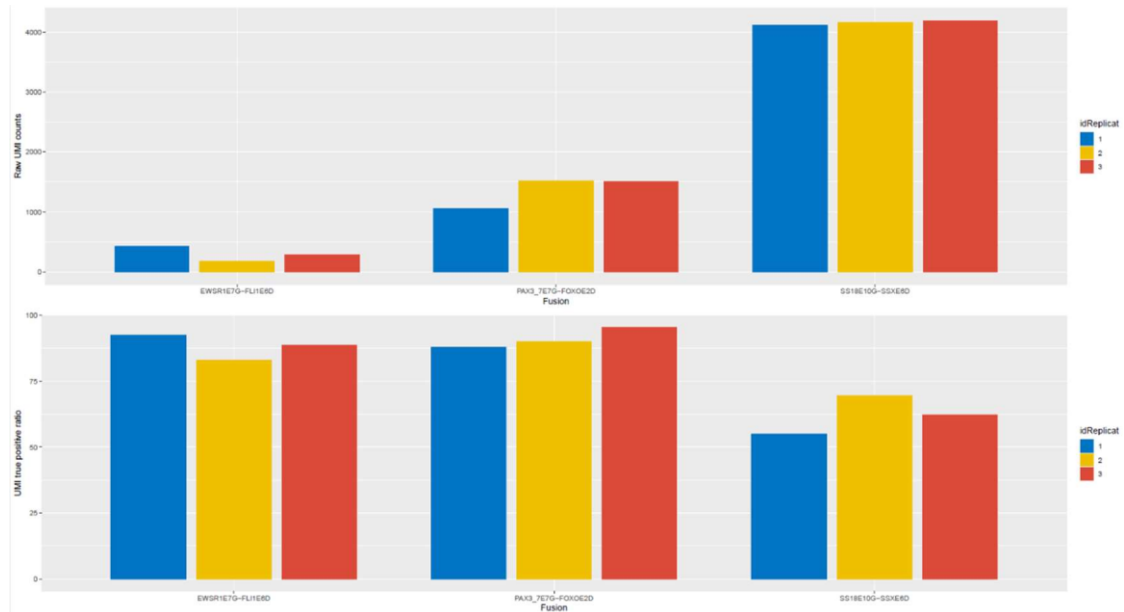


Figura 1: Os histogramas representam, na parte superior, o número bruto de UMIs detectadas e, na parte inferior, o número bruto de UMIs em relação ao número total de UMIs da amostra, de acordo com a fusão esperada e as réplicas.

### Repetibilidade entre corridas

Foram estudadas 5 amostras analisadas pelo teste SarcomaFusion em 3 corridas diferentes (Figura 2). Os dados de contagem para cada fusão são perfeitamente comparáveis.

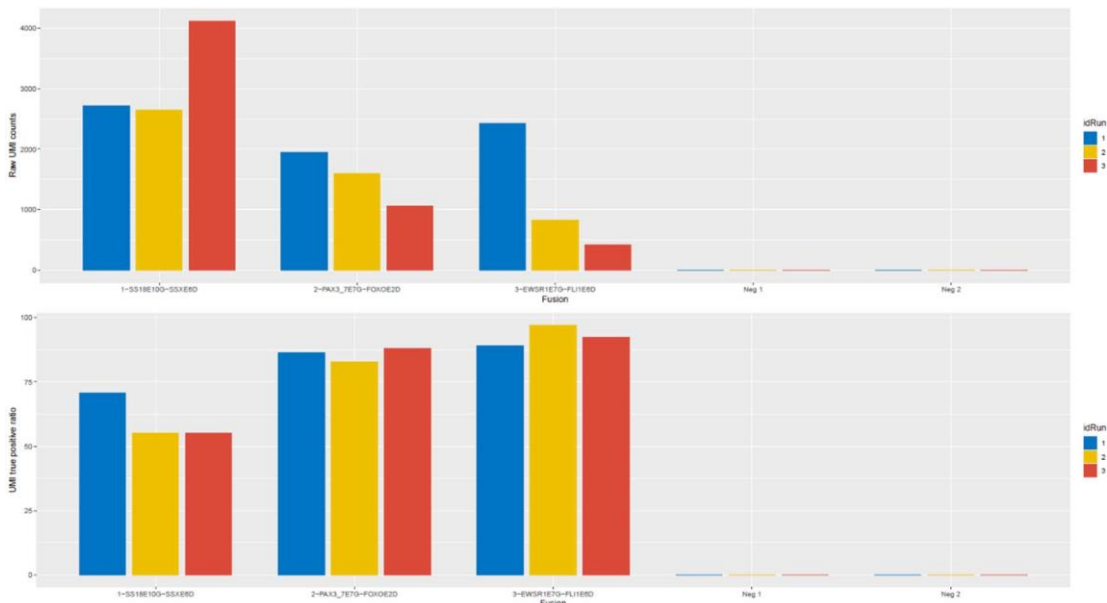


Figura 2: Os histogramas representam, na parte superior, o número bruto de UMI detectadas e, na parte inferior, o número bruto de UMI em relação ao número total de UMI da amostra, de acordo com a fusão esperada e a corrida.

### Reprodutibilidade

A reprodutibilidade refere-se à capacidade do teste SarcomaFusion para detetar translocações entre diferentes utilizadores em condições idênticas.

De forma a avaliar este parâmetro, foram analisadas 5 amostras por 3 utilizadores diferentes:

- 3 amostras positivas (exão 10 do SS18 - exão 6 do SXX, exão 7 do PAX3\_7 - exão 2 do FOXO, exão 7 do EWSR1 - exão 6 do FLI1)
- 2 amostras negativas (linhas celulares)

Os dados, apresentados na Figura 3, mostram uma quantificação reprodutível entre diferentes utilizadores.

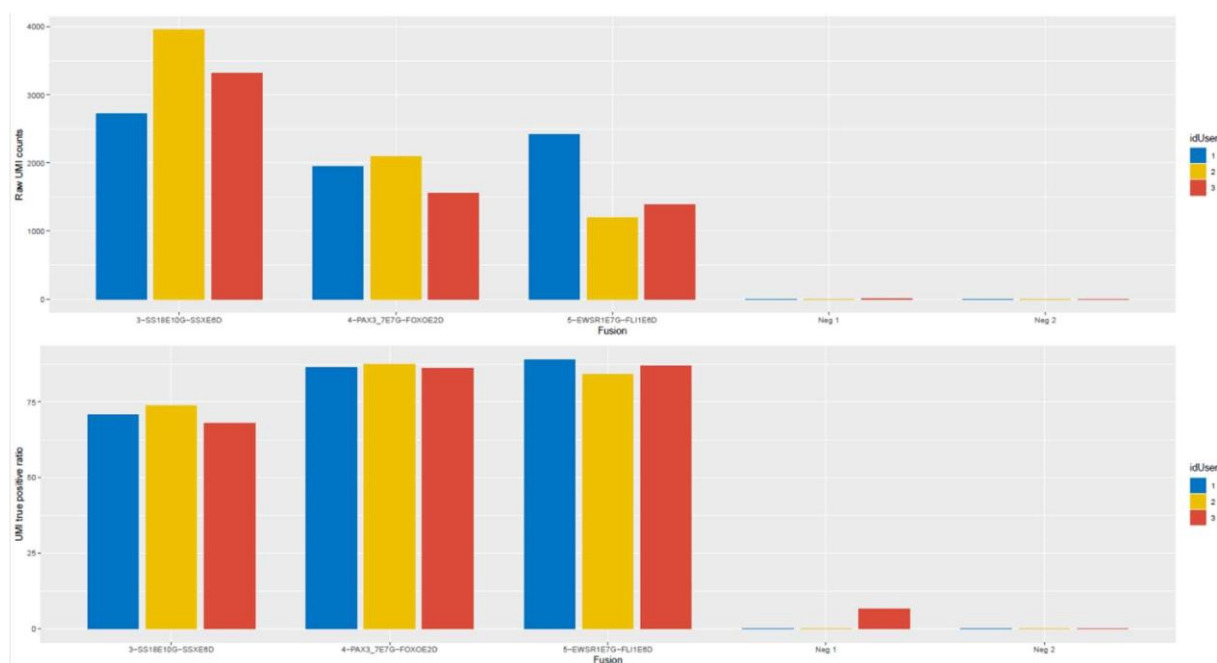


Figura 3: Os histogramas representam, na parte superior, o número bruto de UMI detectadas e, na parte inferior, o número bruto de UMI em relação ao número total de UMI da amostra, de acordo com a fusão esperada e o utilizador.

### Análítico sensibilidade

A sensibilidade analítica do teste SarcomaFusion é definida como a sua capacidade de detetar translocações em função da quantidade de ARN na amostra e da percentagem de células tumorais na amostra.

Para determinar estes dois limites de sensibilidade, foram efectuadas duas diluições em série a partir de 2 amostras:

- Uma diluição em água para simular uma queda na quantidade de ARN
- Uma diluição da amostra a testar no ARN universal, a fim de simular uma diminuição do enriquecimento do tumor

Os resultados são apresentados na Figura 4.

A diluição de duas amostras de controlo para quantidades iniciais de 529 e 489 ng de ARN em água livre de nuclease mostra que as fusões esperadas são ainda detectadas em quantidades de 4 ng de ARN. Mesmo que a quantificação das fusões dependa do enriquecimento tumoral da amostra testada, o limite obtido é bastante inferior às recomendações para a utilização do teste SarcomaFusion (entre 50 e 500 ng).

A segunda gama de diluições efectuada a partir de duas amostras positivas e de ARN universal mostra que as anomalias esperadas são sempre detectadas a 3% da amostra de tumor. Com 0% de ARN positivo, o teste já não detecta qualquer vestígio das fusões.

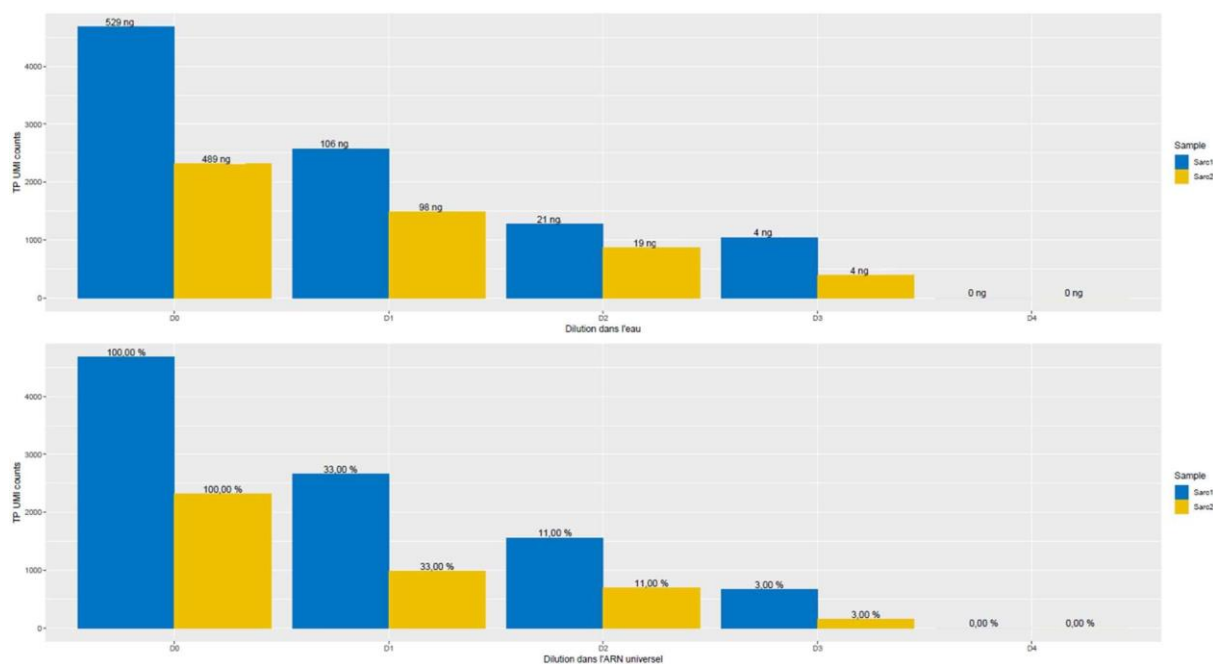







Figura 4: Os histogramas representam o número bruto de UMIs detectadas a partir das fusões esperadas em duas amostras, de acordo com os intervalos de diluição efectuados em água (em cima) ou em ARN universal (em baixo).

## Bibliografia

Detection of sarcoma fusions by a next-generation sequencing based-ligation-dependent multiplex RT-PCR assay. Lanic MD et al., Mod Pathol 2022 (PMID : 35075283).

## Tabela de símbolos

 fabricante	<b>REF</b> Nome do reagente
 data de fabrico	 limite de temperatura
 Prazo de validade	 utilizar o manual de instruções
<b>LOT</b> Código do lote	<b>CE</b> Marcação CE conformidade europeia
	<b>IVD</b> <i>dispositivo médico de diagnóstico in vitro</i>

## Notas

Os reagentes **GENEXPATH SarcomaFusion** estão protegidos por direitos de propriedade intelectual e não podem ser modificados, reproduzidos, vendidos ou transferidos sem a autorização do fabricante.

As informações contidas neste documento são susceptíveis de sofrer alterações.