

SarcomaFusion

ENGLISH	2
FRANCAIS.....	26
DEUTSCH.....	50
ESPAÑOL	74



ENGLISH

GENEXPATH SarcomaFusion user guide

User precautions.



In vitro diagnostic medical device according to Directive (EU) 98/79/EC



For *in vitro* diagnostic use

It is for professional use only.

Read all information in this user guide before use.

Contacts:

Manufacturer: GENEXPATH

+33 (0)2.78.08.98.69

113 avenue des Martyrs de la Résistance

76100 Rouen - France

contact@genexpath.com

support@genexpath.com



ENGLISH	2
Important precautions.....	5
General recommendations.	5
Icons.....	5
Intended use	6
Test principle.....	6
Reagents.	7
Content of GENEXPATH SarcomaFusion reagent kit.	7
Format of reagent kits sold and quantities:.....	8
Reagents not supplied in the reagent kit:.....	9
Required equipment:	9
Before starting.	10
Biological samples.....	10
Programming the thermocyclers.	10
Programme 1: Pre-PCR.....	10
Programme 2: PCR.	11
Detailed protocol.....	11
Step 1: Reverse transcription.....	11
Required reagents.	11
Reverse transcription.	11
Step 2: Hybridization of probes.	12
Required reagents.....	12
Hybridization of probes.....	12
Step 3: Ligation.....	12
Required reagents.....	12
Ligation.	13
Step 4: Amplification and incorporation of barcodes and adapters.	13
Required reagents.....	14
Amplification.	14
Step 5: Purification and assay of sequencing libraries.	14
Required reagents.....	15
Step 5.a: Purification of sequencing libraries.	15
Step 5.b: Assay of sequencing libraries.....	15

Step 6: Dilution, pooling and sequencing of libraries.....	15
Required reagents.....	15
Sequencing on an Illumina MiSeq sequencer.....	15
• Step 6.a: Dilution and pooling of libraries.....	16
• Step 6.b: Denaturation and dilution of the libraries pool.....	16
• Step 6.c: Preparation of the sequencing primers.....	16
• Step 6.d: Preparation of the injection sheet.....	16
• Step 6.e: Start of sequencing.....	17
Sequencing on an Illumina NextSeq 500/550 platform.....	17
• Step 6.a: Dilution and pooling of libraries.....	17
• Step 6.b: Denaturation and dilution of the libraries pool.....	17
• Step 6.c: Preparation of the sequencing primers.....	17
• Step 6.d: Preparation of the injection sheet.....	18
• Step 6.e: Start of sequencing.....	18
Step 7: Results analysis.....	18
Limits of the procedure.....	19
Characterization of performances.....	19
Analytical performance on reference samples.....	19
Table 1 : Summary of the results.....	20
Analytical performances on a cohort of patients.....	20
Repeatability.....	21
Repeatability intra-run.....	21
Repeatability inter-runs.....	21
Reproducibility.....	22
Analytical sensibility.....	23
Bibliography.....	24
Table of symbols.....	25
Notes.....	25

Important precautions.

General recommendations.

- Usable for *in vitro* diagnostic use
- Follow laboratory best practices in terms of handling PCR products (wear disposable overalls and gloves, mark out dedicated zones for pre- and post-PCR, use filter tips).
- Also take precautions to avoid nuclease contamination likely to cause RNA and DNA degradation (use nuclease-free reagents and consumables).
- Ensure that the thermocyclers are in working order and calibrated based on manufacturer recommendations.
- It is particularly important not to substitute reagents not included in the kit, particularly buffers and enzymes used during the reverse transcription, ligation and PCR amplification steps. The incubation temperatures and times, as well as volumes and concentrations, must also be respected.
- The **SarcomaFusion** test kit contains a GAPDH internal positive control. It is strongly recommended to complete it to check that your experiment has been carried out correctly.
- **GENEXPATH SarcomaFusion** reagents are only intended for use with Illumina's MiSeq or NextSeq 500/550 sequencing platforms.
- Safety data sheets are available in the user space.
- If the user lights out errors in the instruction manual: please send an email at contact@genexpath.com
- Any serious incident occurring in connection with the device must be notified to us at contact@genexpath.com.

Icons



Important points and critical steps of the protocol that could compromise result quality.



Steps where the protocol may be suspended.

Intended use

This protocol is intended for **GENEXPATH SarcomaFusion** testing. It is used to prepare sequencing libraries for Illumina's MiSeq or NextSeq 500/550 sequencers.

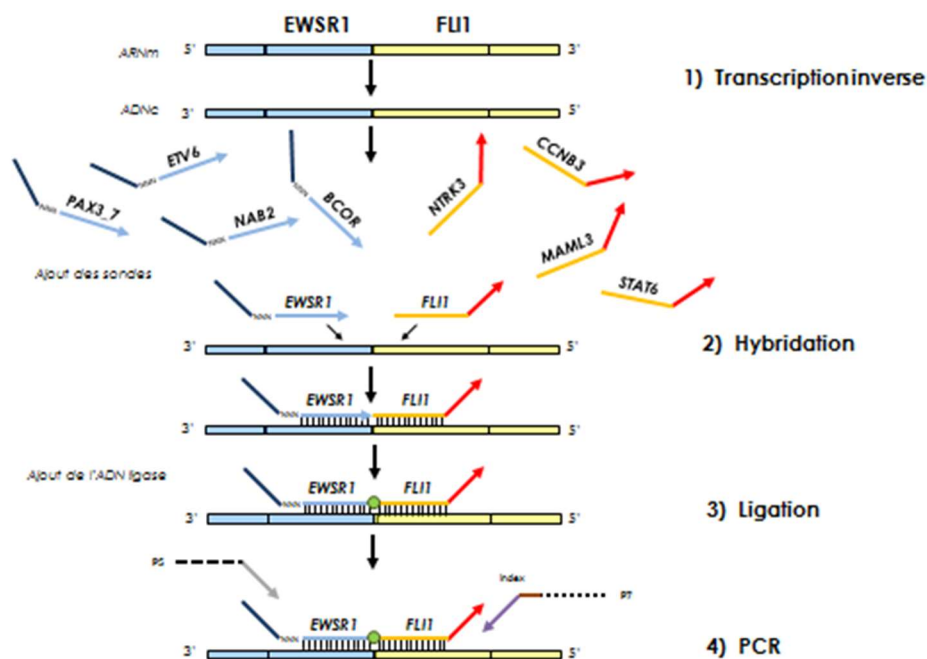
The fastQ files generated using this test contain data about counting sequences corresponding to the potential presence of a fusion transcript, i.e. ligation of two probes and their amplification.

They can be analysed using **GENEXPATH RT-MIS** software, which contains a specific sequence demultiplexing application.

By studying 138 genes, this test can detect fusion transcripts found in 58 types of bone and soft tissue tumours.

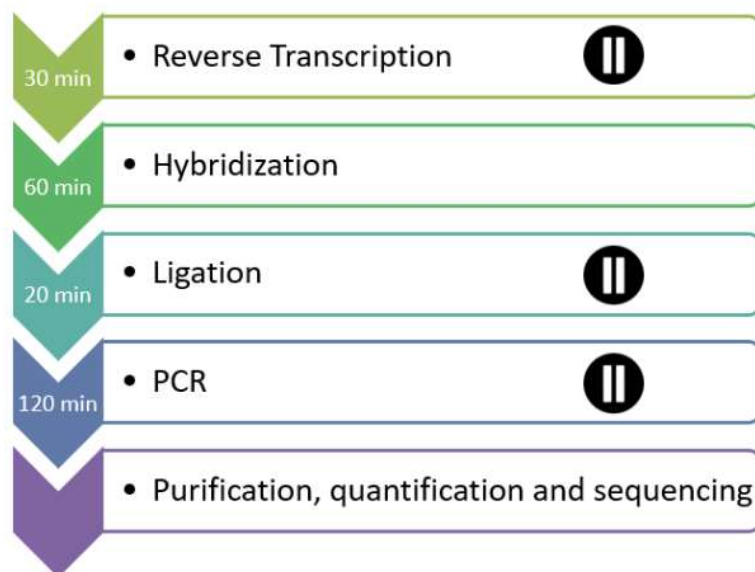
Test principle.

The **GENEXPATH SarcomaFusion** test uses a ligation-dependent RT-PCR method (LD-RT-PCR). This semi-quantitative technique helps detect chromosome translations using specific oligonucleotide probe pairs. A probe pair for a control gene (GAPDH) is included in the test probe mix allowing an internal control of your experiment.



Four steps are sufficient to obtain libraries from a total RNA extraction.

- A reverse transcription (RT) step.
- A hybridization of specific oligonucleotide probes step.
- A ligation step.
- A PCR amplification step.



No purification is required until the libraries are obtained, which limits material losses and ensures this technique has excellent sensitivity. Also, the gene sequences targeted by the probes are particularly short (between 40 and 60 bases), which ensures excellent robustness with regards to RNA degradation.

LD-RT-PCR is therefore a particularly appropriate approach for analysing difficult biological samples like fixed paraffin-embedded tissue biopsies.

For each sample, around 10^5 sequences are sufficient to obtain an analysable expression profile, which helps test a large number of samples simultaneously in the same sequencing FlowCell. **GENEXPATH SarcomaFusion** libraries can also be loaded at the same time as other sequencing libraries, generated by other methods.

Reagents.

Content of GENEXPATH SarcomaFusion reagent kit.

GENEXPATH SarcomaFusion probe mix	GEP-SFPM
GENEXPATH SarcomaFusion barcodes	GEP-BC-xxx
GENEXPATH SarcomaFusion sequencing primer	GEP-SP-001
GENEXPATH SarcomaFusion GAPDH barcodes	GEP-BCC-xxx
GENEXPATH SarcomaFusion GAPDH sequencing primer	GEP-SP-002

XXX: barcode number

On receipt, these reagents should be stored between -30°C and -15°C.

They are ready to use and do not need to be diluted.

The shelf life of the reagents is 1 year.

Return to storage conditions immediately after use.

Do not use reagents after their expiration date stated on the label.

Format of reagent kits sold and quantities:

	Reagent kit - U = number of analyses			
	8U	16U	24U	48U
GEP-SFPM probe mix	30 µL	48 µl	54 µl	108 µL
Barcodes GEP-BC-xxx (from 001 to 032 depending on number of analyses purchased) BC=barcode	8 BC	8 BC	12 BC	24 BC
	N°017 to 024	N°001 to 008	N°021 to 032	N°001 to 024
	5µL/BC	8µL/BC	6µL/BC	6µL/BC
GEP-SP-001 sequencing primers	96 µL	144 µL	180 µL	360 µL
For the internal control				
GAPDH barcodes GEP-BCC-xxx (from 001 to 032 depending on number of analyses purchased) BCC=control barcode	8 BCC	8 BCC	12 BCC	24 BCC
	N°017 to 024	N°001 to 008	N°021 to 032	N°001 to 024
	5µL/BCC	8µl/BCC	6µL/BCC	6µL/BCC
GAPDH sequencing primers GEP-SP-002	96 µL	144 µL	180 µL	360 µL

Reagents are supplied in larger quantities than actually required. After the ordered number of analyses has been completed, they should be discarded. If a new order is placed, new reagents will be delivered.

For a reagent kit with more than 8 analyses, each barcode will be used for 2 different analyses.

Reagents not supplied in the reagent kit:

Reagents	Suppliers and references
SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, ref 11754250
SALSA MLPA Buffer	MRC Holland, ref SMR33
SALSA Ligase Buffer A	MRC Holland, ref SMR12
SALSA Ligase Buffer B	MRC Holland, ref SMR13
SALSA Ligase 65	MRC Holland, ref SMR20
Red'y' Star PCR Mix	Eurogentec, ref PK-0073-02R
AMPure XP (Magnetic beads)	Beckman Coulter, ref A63880
Qubit® dsDNA HS Assay	Fisher Scientific, ref 10616763
Sequencing reagents	Illumina
TE buffer (10 mM Tris-Acetate pH 8.0, 1 mM EDTA)	Variable
Ethanol 100%	Variable
NaOH 1 N	Variable
Tris Buffer 200 mM pH 7	Variable
Nuclease-Free Water	Variable

On receipt and between each use, these reagents should be stored based on supplier recommendations.

Required equipment:

Equipment	Suppliers and references
Thermocycler in pre-PCR zone	Variable
Thermocycler in post-PCR zone	Variable
Qubit® Fluorometer (or equivalent)	Thermo Fisher Scientific, ref Q33238
Qubit® Assay Tubes	Fisher Scientific, ref 12037609
DynaMag™-96 Side Magnet - Magnetic plate (AMPure XP purification)	Thermo Fisher Scientific, ref 12331D
PCR 200 µL plates and tubes	Variable

Before starting.

Biological samples.

The **GENEXPATH SarcomaFusion** test is used to prepare sequencing libraries using total RNA extractions from sarcoma tumour biopsies or tissues (bone and soft tissue tumours).

These samples may be fresh, frozen or formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE).

To extract RNA from fixed tissues, we recommend using the kit Promega Maxwell® RSC RNA FFPE (Promega, ref AS1440 and AS4500).

The amount of RNA to be analysed should be between **50 and 500 ng, in a volume of 2 µL**. If the concentration of the solutions to be analysed is too high, this RNA can be diluted in nuclease-free water.

Programming the thermocyclers.

To limit the risks of contamination, use two thermocyclers, one in the pre-PCR zone and one in the post-PCR zone.

Two programmes are required:

- The first is for the first three steps of the protocol: **reverse transcription of RNA to cDNA, hybridization of oligonucleotide probes, and ligation**. It must be run on the thermocycler located in the pre-PCR zone.
- The second is used to amplify ligation products and incorporate the barcodes and adapters required for sequencing. It must be run on the thermocycler located in the post-PCR zone.

Programme 1: Pre-PCR.



As the reaction volumes are small, ensure that the temperature of the thermocycler's heated lid remains high (95°C) at all steps of the programme to avoid evaporation.

Breaks at 4°C or 54°C are provided between the different programme steps to add the required reagents.

Step 1: Reverse transcription of RNA to cDNA.

- Heated lid: 95°C
- 10 minutes 25°C
- 60 minutes at 42°C
- 5 minutes 85°C
- 4°C infinite

Step 2: Hybridization of probes.

- Heated lid: 95°C
- 2 minutes 95°C
- 60°C infinite (1 hour of hybridization)

Step 3: Ligation.

- Heated lid: 95°C
- 54°C infinite (distribution of ligation mix)
- 15 minutes 54°C
- 5 minutes 98°C
- 4°C infinite

Programme 2: PCR.

- Heated lid: 95°C
- 6 minutes 94°C
- 35 x (30 seconds 94°C; 30 seconds 58°C; 30 seconds 72°C)
- 4 minutes 72°C
- 4°C infinite

Detailed protocol.**Step 1: Reverse transcription.**

This step must be completed in the pre-PCR zone.

Required reagents.

- 5X Vilo reaction mix, 10X super script (SuperScript Vilo cDNA Synthesis Kit), nuclease-free water, total RNA extraction to test (25 to 250 ng/μL).



It is recommended to carry out the entire procedure in 200 μL PCR plates or tubes.

Reverse transcription.

- Thaw the following reagents, then keep them on ice or in a cooling rack: 5X Vilo reaction mix and 10X super script.
- Prepare a reverse transcription mix. For each sample, mix (for a total volume of 3 μL per reaction):

○ 5X Vilo reaction mix	1 μL
○ Nuclease-free water	1 μL
○ 10X super script	0.5 μL
- Distribute this mix in 200 μL PCR tubes (2.5 μL per tube) kept on ice or in a cooling rack:
- Add 2.5 μL of each of the total RNA solutions to the different tubes.

- Vortex, centrifuge briefly.
- Place the tubes in the thermocycler in the pre-PCR zone, and proceed to **step 1 of the Pre-PCR programme** (Reverse transcription of RNA to cDNA).



Then proceed directly to **step 2**, or keep the ligation products between -30°C and -15°C.

Step 2: Hybridization of probes.

This step must be completed in the pre-PCR zone.

Required reagents.

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

Hybridization of probes.

- **At the end of step 1**, when the thermocycler temperature has dropped to 4°C, remove the tubes, centrifuge them briefly, and place them on ice or in a cooling rack.
- Thaw the Salsa MLPA buffer and the **GENEXPATH SarcomaFusion** probe mix, then keep them on ice or in a cooling rack.
- Prepare a hybridization mix. For each sample, mix (for a total volume of 3 µL per reaction):

○ Salsa MLPA Buffer	1.5 µL
○ GENEXPATH SarcomaFusion probe mix	1.5 µL
- Vortex, centrifuge briefly.
- Add 3 µL of this mix to each cDNA tube.
- Centrifuge briefly.
- Place the tubes back in the thermocycler.
- Check the temperature of the heated lid (95°C).
- Proceed to **step 2 of the pre-PCR programme** (hybridization of probes).

Step 3: Ligation.

This step must be completed in the pre-PCR zone.

Required reagents.

- SALSA Ligase Buffer A, SALSA Ligase Buffer B, SALSA Ligase 65, nuclease-free water.

Ligation.

- 15 minutes before the end of step 2, thaw SALSA Ligase Buffer A and SALSA Ligase Buffer B and keep them on ice or in a cooling rack.
- Place the Salsa Ligase 65 enzyme on ice or in a cooling rack.
- Prepare a ligation mix. For each sample, mix (for a total volume of 32 µL per reaction):

○ Nuclease-free water	25 µL
○ Salsa Ligase Buffer A	3 µL
○ Salsa Ligase Buffer B	3 µL
- Vortex, centrifuge briefly

○ Salsa Ligase 65	1 µL
-------------------	------
- Vortex, centrifuge briefly.
- After 60 minutes of incubation, proceed to **step 3 of the pre-PCR programme (ligation)**.
- Lower the temperature of the heated block to 54°C.
- Add 32 µL of the ligation mix directly to each tube, without removing them from the heated block.
- After distributing the mix, proceed to the next step of the programme (15 minutes at 54°C, 5 minutes at 98°C).



At the end of this step, when the temperature of the PCR block drops to 4°C, immediately proceed to step 4 (PCR amplification) or freeze the ligation products (between -30°C and -15°C).



After this step, do not keep products at higher temperatures (e.g. 4°C or room temperature) to avoid non-specific ligations which could result from residual enzyme activity.

Step 4: Amplification and incorporation of barcodes and adapters.

In this step, the ligation products are amplified by PCR thanks to additional tails at the end of the probes. These amplifications are carried out using pairs of primers supplied in the **GENEXPATH SarcomaFusion** barcode tubes (GEP-BC-xxx).

To allow analysis of several samples in the same FlowCell, the PCR 3' primer has a molecular barcode which will be recognised by the demultiplexing algorithm of the **GENEXPATH RT-MIS** platform.

To carry out the internal control with GAPDH probes, two different PCR are completed, so you must double the number of tubes. For a given sample, you must use the same barcode number GEP-BC-xxx and GEP-BCC-xxx for information analysis. So you must add, for each sample, in one tube the barcode GEP-BC-xxx and in the other the associated barcode GEP-BCC-xxx.

Required reagents.

- **GENEXPATH SarcomaFusion** barcodes (GEP-BC-xxx), **GENEXPATH SarcomaFusion** GAPDH barcodes (GEP-BCC-xxx), Red'y' Star PCR Mix, nuclease-free water.

Amplification.

- Prepare an amplification mix in the pre-PCR zone. For each sample, mix (for a total volume of 18 µL per reaction):
 - o Red'y' Star PCR Mix 12.5 µL
 - o Nuclease-free water 5.5 µL
- Vortex, centrifuge briefly.
- Distribute 18 µL of this amplification mix in the different wells in a PCR plate.
- Add 5 µL of ligation products generated in step 3 to each of the wells.
- Add 2 µL of **GENEXPATH SarcomaFusion** barcode (GEP-BC-xxx or GEP-BCC-xxx depending on test).



Use different GEP-BC-xxx barcodes for each tested sample, but for the same sample, use the same number for GEP-BC-xxx and GEP-BCC-xxx.

- Place the plate in the thermocycler in the post-PCR zone.
- Start **programme 2** (PCR).



At the end of the programme, when the temperature of the thermocycler drops to 4°C, quickly proceed to step 5 (purification) or freeze the amplification products between -30°C and -15°C.



Do not keep these products at higher temperatures for a long period (e.g. 4°C in the thermocycler or at room temperature).

Step 5: Purification and assay of sequencing libraries.

At the end of the amplification step, the sequencing libraries should be purified to eliminate PCR primers and unincorporated nucleotides. This purification uses AMPure XP magnetic beads. The libraries should be assayed via fluorimetry with the Qubit® dsDNA HS kit before loading in the sequencer.

Required reagents.

- Ethanol 100%, nuclease-free water, AMPure XP beads, TE buffer (10 mM Tris-Acetate pH 8.0, 1 mM EDTA), Qubit® dsDNA HS Assay.

Step 5.a: Purification of sequencing libraries.



Ensure that the beads are completely re-suspended before use.

- Purify 25 µL of PCR products with 45 µL of AMPure XP beads (following manufacturer recommendations).
- Elute the purified PCR products in 50 µL of TE buffer.



After purification, the libraries can be stored between -30°C and -15°C before sequencing.

Step 5.b: Assay of sequencing libraries.

- Assay 10 µL of each sequencing library via fluorimetry using the Qubit® dsDNA HS Assay kit.

Step 6: Dilution, pooling and sequencing of libraries.

After purification, the **GENEXPATH SarcomaFusion** libraries must be diluted, pooled and loaded in the sequencer.



For optimal results, a minimum of 10⁵ sequences should be read for each sample.

Unlike most classic sequencing libraries, the reading of molecular barcodes required for demultiplexing **GENEXPATH SarcomaFusion** sequences takes place during read1. These sequences are not demultiplexed automatically by the sequencer, and will be saved in “Undetermined” fastQ files. Demultiplexing is carried out using the specific algorithm provided on the **GENEXPATH RT-MIS** platform.

Required reagents.

- **GENEXPATH SarcomaFusion** sequencing primer (GEP-SP-001), **GENEXPATH SarcomaFusion** control sequencing primers (GEP-SP-002) (if internal control completed), Illumina sequencing reagents.

Sequencing on an Illumina MiSeq sequencer.

For detailed information about dilution and denaturation of libraries, preparation of the sequencing primer, the injection sheet and the start of sequencing, refer to the Illumina guide to the MiSeq system.

- **Step 6.a: Dilution and pooling of libraries.**

- Dilute each **GENEXPATH SarcomaFusion** library at a concentration between 2 nM and 4 nM, considering an average amplified fragment size of 150 pb.
- Pool **GENEXPATH SarcomaFusion** libraries in the equivalent volume.
- If other libraries are sequenced on the same FlowCell, adjust the concentrations of different pools then combine them to obtain the desired sequence numbers (minimum 10^5 sequences for each **GENEXPATH SarcomaFusion** library).

Example: For a pool of 10 **GENEXPATH SarcomaFusion** libraries requiring 1 M sequences (10^5 sequences for each library), sequenced with a pool of libraries B at the same concentration and requiring 3 M sequences, mix 1 μ L of the **GENEXPATH SarcomaFusion** libraries pool and 3 μ L of the pool of libraries B.

- **Step 6.b: Denaturation and dilution of the libraries pool.**

- Denature and dilute the final pool based on recommendations in the Illumina guide to the MiSeq system, to obtain a final load concentration of 8 to 10 pM.

- **Step 6.c: Preparation of the sequencing primers.**

- If the **GENEXPATH SarcomaFusion** libraries pool is sequenced alone, dilute 3 μ L of each **GENEXPATH SarcomaFusion** sequencing primer (GEP-SP-001 and GEP-SP-002, if internal control) in a final volume of 600 μ L of HT1 buffer, then place this 600 μ L in well 18 of the MiSeq reagent cartridge.
- If the **GENEXPATH SarcomaFusion** libraries pool is loaded with other libraries sequenced using Illumina sequencing primers, pipette the entire content of well 12 (around 600 μ L), add 3 μ L of each **GENEXPATH SarcomaFusion** sequencing primer (GEP-SP-001 and GEP-SP-002 if internal control), then place this mix in well 18 of the cartridge.

- **Step 6.d: Preparation of the injection sheet.**

- If the **GENEXPATH SarcomaFusion** library is sequenced alone, create the injection sheet to generate FASTQ files with 120 cycles in read 1.
- If **GENEXPATH SarcomaFusion** libraries are combined with other sequencing libraries, generate the injection sheet using the usual parameters, without entering the **GENEXPATH SarcomaFusion** samples.
- Specify the use of custom during run setup (with Local Run Manager on the Create Run page. In manual run mode, on the Run Setup screen).



In all cases, ensure that read 1 is carried out with a minimum of 120 cycles and the Custom Primer for Read 1 box is ticked.



- In all cases, the **GENEXPATH SarcomaFusion** library sequences will not be demultiplexed by the sequencer but will be saved in an “Undetermined” FastQ file, which will then be loaded on the **GENEXPATH RT-MIS** platform.
- **Step 6.e: Start of sequencing.**
 - Start sequencing by following the procedure described in the Illumina guide to the MiSeq system.

Sequencing on an Illumina NextSeq 500/550 platform.

For detailed information about dilution and denaturation of libraries, preparation of the sequencing primer, the injection sheet and the start of sequencing, refer to the Illumina guide to the NextSeq system.

- **Step 6.a: Dilution and pooling of libraries.**
 - Dilute each **GENEXPATH SarcomaFusion** library at a concentration between 0.5 nM and 4 nM, considering an average amplified fragment size of 150 pb.
 - Pool **GENEXPATH SarcomaFusion** libraries in the equivalent volume.
 - If other libraries are sequenced on the same FlowCell, adjust the concentrations of different pools then combine them to obtain the desired sequence numbers (minimum 10^5 sequences for each **GENEXPATH SarcomaFusion** library).

Example: For a pool of 10 **GENEXPATH SarcomaFusion** libraries requiring 1 M sequences (10^5 sequences for each library), sequenced with a pool of libraries B at the same concentration and requiring 3 M sequences, mix 1 μ L of the **GENEXPATH SarcomaFusion** libraries pool and 3 μ L of the pool of libraries B.

- **Step 6.b: Denaturation and dilution of the libraries pool.**
 - Denature and dilute the final pool based on recommendations in the Illumina guide to the NextSeq system, to obtain a final load concentration of 0.8 pM to 1 pM.
- **Step 6.c: Preparation of the sequencing primers.**
 - If the **GENEXPATH SarcomaFusion** libraries pool is sequenced alone, dilute 6 μ L of each **GENEXPATH SarcomaFusion** sequencing primer (GEP-SP-001 and GEP-SP002, if internal control) in a final volume of 2000 μ L of HT1 buffer, then place this 2 mL in well 7 of the MiSeq reagent cartridge.
 - If the **GENEXPATH SarcomaFusion** libraries pool is combined with other libraries sequenced using Illumina sequencing primers, pipette the entire content of well 20 (around 2 mL), add 6 μ L of each **GENEXPATH SarcomaFusion** sequencing primer (GEP-SP-001 and GEP-SP-002 if internal control), then place this mix in well 7 of the cartridge.

- **Step 6.d: Preparation of the injection sheet.**

- If the **GENEXPATH SarcomaFusion** library is sequenced alone, create the injection sheet to generate FASTQ files with 120 cycles in read 1.
- If **GENEXPATH SarcomaFusion** libraries are combined with other sequencing libraries, generate the injection sheet using the usual parameters, without entering the **GENEXPATH SarcomaFusion** samples.
- Specify the use of custom during run setup (with Local Run Manager on the Create Run page. In manual run mode, on the Run Setup screen).



In all cases, ensure that read 1 is carried out with a minimum of 120 cycles and the Custom Primer for Read 1 box is ticked.

- In all cases, the **GENEXPATH SarcomaFusion** library sequences will not be demultiplexed by the sequencer, but will be saved in the four “Undetermined” FastQ file, which should then be loaded on the **GENEXPATH RT-MIS** platform.

- **Step 6.e: Start of sequencing.**

- Start sequencing by following the procedure described in the Illumina guide to the NextSeq system.

Step 7: Results analysis.

The sequence files generated by the Illumina sequencing platform (MiSeq or NextSeq) in FastQ format must be analysed using the **GENEXPATH RT-MIS** software available at the following address: <https://connect.genexpath.com/>.



To help download the FastQ file, it should not be decompressed (fastq.gz).

This software is a comprehensive bioinformatics solution which includes different data processing algorithms. It carries out demultiplexing to assign sequences to each sample. It then precisely identifies the gene expression markers and quantifies them.

The **GENEXPATH SarcomaFusion** test is based on quantification of qualitative markers characterising the presence or absence of chromosome translocations.

GENEXPATH RT-MIS generates concise and transparent reports, from implementation of sequencing reactions to automated analysis of sequencing results.

GENEXPATH RT-MIS requires sequencing files to be loaded in FASTQ format, as well as the list of barcodes used during testing.

GENEXPATH RT-MIS assesses the sequencing quality of each sample by quantifying the number of reads identified and the number of UMI (unique molecular identifiers) detected.



For each sample, **GENEXPATH RT-MIS** generates an analysis report indicating the presence or absence of a fusion transcript, the number of reads and UMI obtained, as well as a bibliography reference corresponding to the transcript (if a fusion has been detected). This data can be downloaded.

GENEXPATH RT-MIS includes a user guide directly accessible online to explain how to use the tool, to describe all generated results and explain the presentation of results.

The company **GENEXPATH** does not permanently store results generated by the software **GENEXPATH RT-MIS**. The data must be downloaded directly after each analysis and saved by the user in their document management system.

Limits of the procedure

- The SarcomaFusion test was developed based on data from the literature to detect the most frequent fusion transcripts in patients with sarcoma. It is intended for FFPE use or frozen samples, possibly obtained from needle biopsies.
- The performance demonstrated in the “Characterization of performance” paragraph has been validated according to the instructions set out above.
- A low amount of RNA or a low quality sample may cause an uninterpretable result.
- Sequencing must be performed with Illumina technology sequencers (Miseq and NextSeq).

Characterization of performances

Analytical performance on reference samples

To demonstrate the analytical performance of the SarcomaFusion test, i.e. its ability to detect translocations, several reference samples were analyzed:

- 4 RNAs extracted from FFPE samples (3 positive and 1 negative)
- 3 RNAs extracted from frozen samples (all positive)
- 2 cell lines (all negative)

Positive samples refer to samples for which fusions were known and validated. These samples were analyzed according to the procedure described in this instruction manual and the results of the SarcomaFusion test are reported in Table 1.

Table 1 : Summary of the results

samples	expected result / <i>obtained</i>	predictive value	
sample 1	EWSR1 exon 7 - CREB1 exon 7 <i>EWSR1 exon 7 - CREB1 exon 7</i>	Real positive	6
sample 2	JAZF1 exon 3 - SUZ12 exon 2 <i>JAZF1 exon 3 - SUZ12 exon 2</i>	Real negative	3
sample 3	PAX3_7 exon 7 - FOXO exon 2 <i>PAX3_7 exon 7 - FOXO exon 2</i>	Positive Predicted value	100%
sample 4	Negative <i>no fusion detected</i>	Recall	100%
sample 5	SS18 exon 10 – SSX exon6 <i>SS18 exon 10 – SSX exon6</i>	False positive rate	0%
sample 6	PAX3_7 exon 7 – FOXO exon 2 <i>PAX3_7 exon 7 – FOXO exon 2</i>	Sensibility	100%
sample 7	EWSR1 exon 7 – FLI1 exon 6 <i>EWSR1 exon 7 – FLI1 exon 6</i>	False positive	0
cell line 1	Negative <i>No fusion detected</i>	False negative	0
cell line 2	Negative <i>no fusion detected</i>	Negative predicted value	100%
		Accuracy	100%
		False negative rate	0%
		Specificity	100%

The results demonstrate that the SarcomaFusion test provides high sensitivity and specificity for the detection fusion transcripts in sarcomas.

Analytical performances on a cohort of patients

A study published in 2022 on 158 bone and soft tissue tumor samples (Lanic MD et al., Modern Pathology, 2022) demonstrated the following performance:

Sensitivity = 98.1%

Specificity = 100%

In this article, the authors report that the few abnormalities not detected by the SarcomaFusion test are explained by:

- The presence of rare or complex translocations not covered by the SarcomaFusion test
- The low quality and quantity of RNA of some samples

Repeatability

The repeatability of the SarcomaFusion assay is defined as its ability to accurately quantify an expected fusion transcript. Two tests were carried out:

- A test to test the repeatability of the results of 3 samples within the same run
- A second allowing to test the repeatability of the results of 5 samples on 3 different runs

Repeatability intra-run

3 analyzed samples in triplicate by the SarcomaFusion test were studied (Figure 1). The count data of each fusion against the replicas is fully comparable.

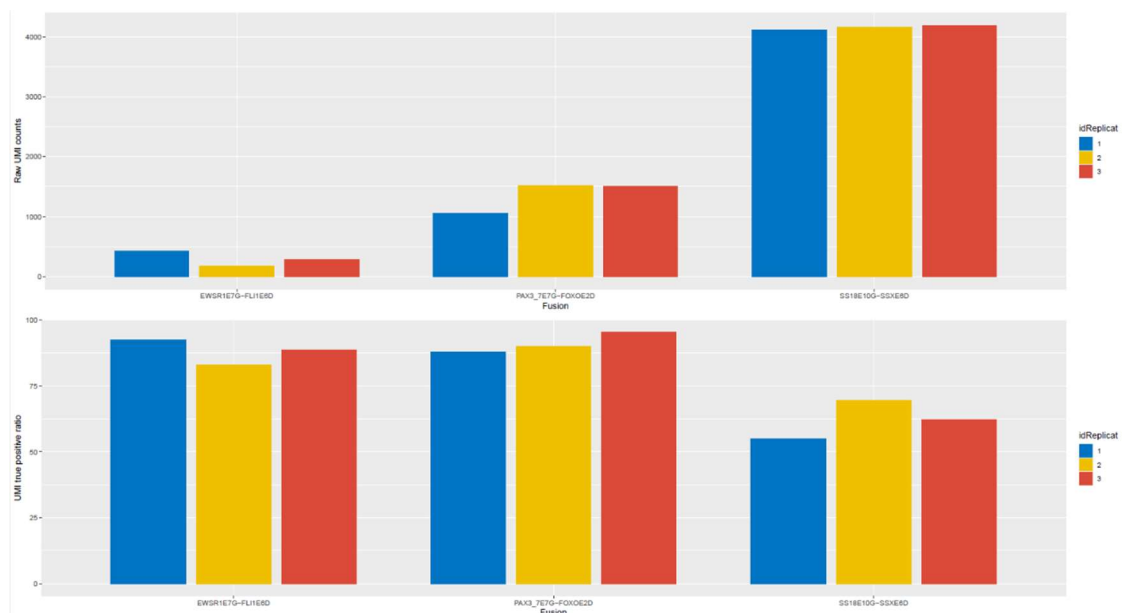


Figure 1: The histograms represent at the top the raw number of UMIs detected and at the bottom the raw number of UMIs related to the total number of UMIs of the sample according to the expected fusion and the replicas.

Repeatability inter-runs

5 samples analyzed by the SarcomaFusion test were studied on 3 different runs (Figure 2). The count data for each fusion is perfectly comparable.

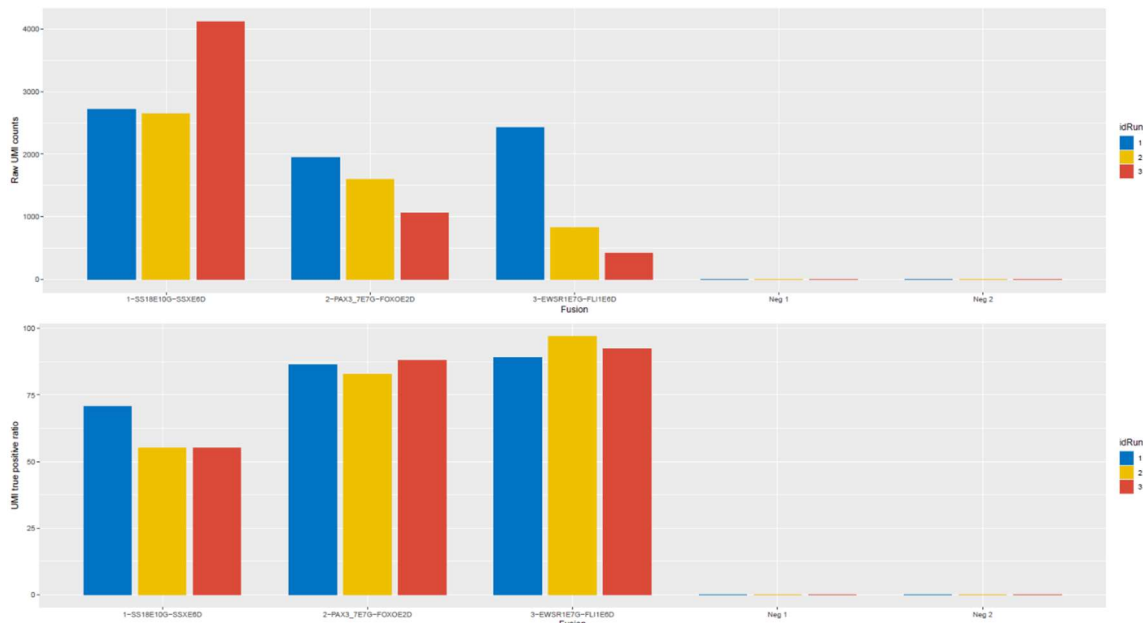


Figure 2: The histograms represent at the top the raw number of UMI detected and at the bottom the raw number of UMI related to the total number of UMI of the sample according to the expected fusion and the run.

Reproducibility

Reproducibility refers to the ability of the SarcomaFusion test to detect translocations between different users under identical conditions.

In order to evaluate this parameter, 5 samples were analyzed by 3 different users:

- 3 positive samples (SS18 exon 10 – SSX exon6, PAX3_7 exon 7 – FOXO exon 2, EWSR1 exon 7 – FLI1 exon 6)
- 2 negative samples (cell lines)

The data, shown in Figure 3, shows reproducible quantification between different users.

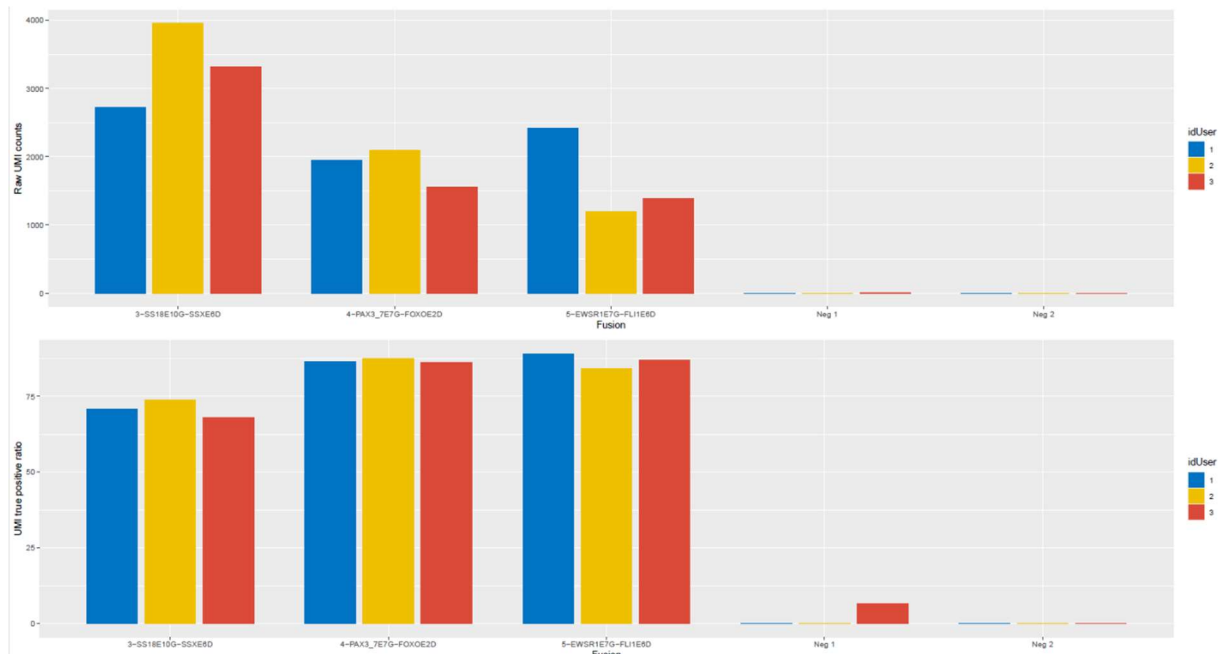


Figure 3: The histograms represent at the top the raw number of UMI detected and at the bottom the raw number of UMI related to the total number of UMI of the sample according to the expected fusion and the user.

Analytical sensibility

The analytical sensitivity of the SarcomaFusion test is defined as its ability to detect translocations as a function of the amount of RNA in the sample and the percentage of tumor cells in the sample.

In order to determine these two sensitivity limits, two serial dilutions were carried out from 2 samples:

- A dilution in water to simulate a drop in the amount of RNA
- A dilution of the sample to be tested in universal RNA in order to simulate a decrease in tumor enrichment

The results are reported in Figure 4.

Dilution of two control samples to initial amounts of 529 and 489 ng RNA in nuclease free water shows that the expected fusions are still detected at 4 ng RNA amounts. Even if the quantification of fusions depends on the tumor enrichment of the sample tested, the limit obtained is well below the recommendations for use of the SarcomaFusion test (between 50 and 500 ng).

The second range of dilutions made from two positive samples and universal RNA shows that the expected anomalies are always detected at 3% of tumor sample. At 0% positive RNA, the test no longer detects any trace of the fusions.

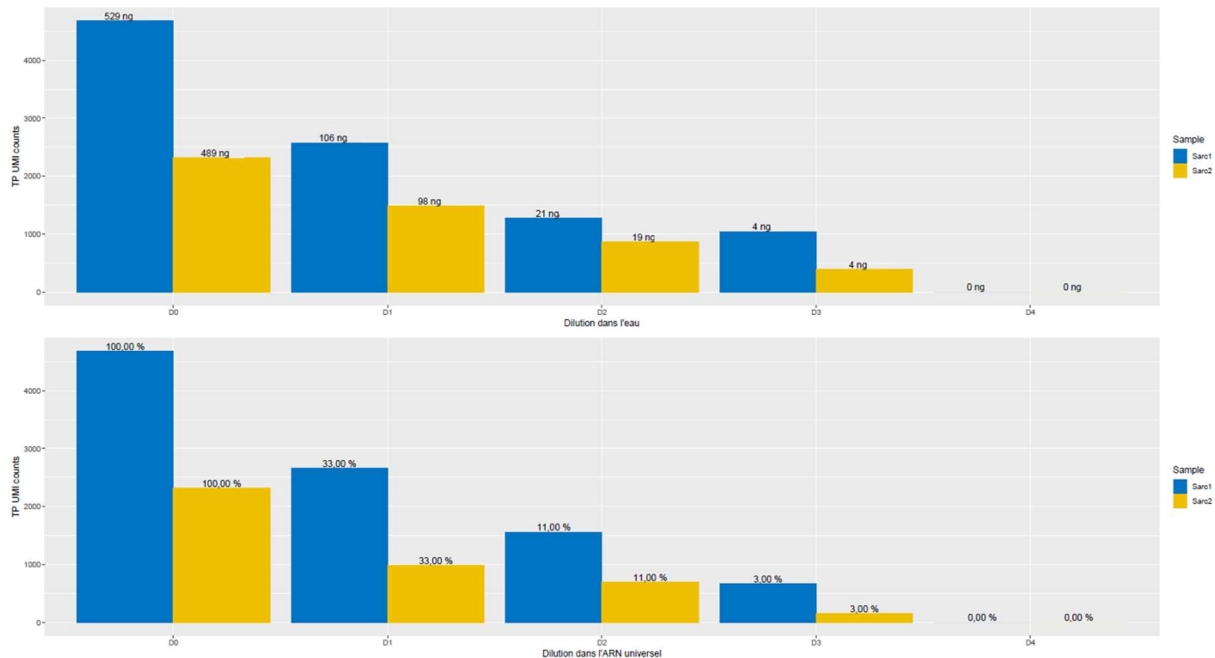


Figure 4: The histograms represent the raw number of UMIs detected from the expected fusions in two samples according to the dilution ranges carried out in water (top) or in universal RNA (bottom).

Bibliography

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).

Table of symbols

 manufacturer	 Reagent name
 manufacturing date	 temperature limit
 Shelf life	 use the instruction manual
 Batch code	 EC marking european conformity
	 <i>in vitro diagnostic medical device</i>

Notes

GENEXPATH SarcomaFusion reagents are protected by intellectual property rights and cannot be modified, reproduced, sold or transferred without the manufacturer's permission.

Information in this document is likely to change.



FRANCAIS

Notice d'utilisation GENEXPATH SarcomaFusion.

Précautions d'utilisation.



Dispositif médical de diagnostic *in vitro* selon la directive (UE) 98/79/CE

Pour un usage de diagnostic *in vitro*

Il est réservé à un usage professionnel.

Prendre connaissance de l'ensemble des informations portées sur la présente notice avant utilisation.

Contacts :

Fabricant : GENEXPATH

+33 (0)2.78.08.98.69

113 avenue des Martyrs de la Résistance

76100 Rouen - France

contact@genexpath.com

support@genexpath.com

FRANCAIS.....	26
Précautions importantes.....	29
Recommandations générales.....	29
Pictogrammes.....	29
Utilisation prévue.....	30
Principe du test.....	30
Réactifs.....	32
Contenu du kit de réactifs GENEXPATH SarcomaFusion.....	32
Format des kits de réactifs commercialisés et quantités :.....	32
Réactifs non fournis dans le kit de réactifs :.....	33
Matériels nécessaires :.....	33
Avant de commencer.....	34
Echantillons biologiques.....	34
Programmation des Thermocycleurs.....	34
Programme 1 : Pré PCR.....	34
Programme 2 : PCR.....	35
Protocole détaillé.....	35
Etape 1 : Transcription inverse.....	35
Réactifs nécessaires.....	35
Transcription inverse.....	35
Etape 2 : Hybridation des sondes.....	36
Réactifs nécessaires.....	36
Hybridation des sondes.....	36
Etape 3 : Ligation.....	37
Réactifs nécessaires.....	37
Ligation.....	37
Etape 4 : Amplification et incorporation des barcodes et adaptateurs.....	38
Réactifs nécessaires.....	38
Amplification.....	38
Etape 5 : Purification et dosage des librairies de séquençage.....	39
Réactifs nécessaires.....	39
Etape 5.a : Purification des librairies de séquençage.....	39
Etape 5.b : Dosage des librairies de séquençage.....	39

Etape 6 : Dilution, pool et séquençage des librairies.	39
Réactifs nécessaires.....	40
Séquençage sur un séquenceur Illumina MiSeq.	40
• Etape 6.a : Dilution et pool des librairies.	40
• Etape 6.b : Dénaturation et dilution du pool de librairies.	40
• Etape 6.c : Préparation des amorces de séquençage.	40
• Etape 6.d : Préparation de la feuille d'injection.....	41
• Etape 6.e : Lancement du séquençage.	41
Séquençage sur une plateforme NextSeq 500/550 Illumina.	41
• Etape 6.a : Dilution et pool des librairies.	41
• Etape 6.b : Dénaturation et dilution du pool de librairies.	42
• Etape 6.c : Préparation des amorces de séquençage.	42
• Etape 6.d : Préparation de la feuille d'injection.....	42
• Etape 6.e : Lancement du séquençage.	42
Etape 7 : Analyse des résultats.	43
Limites de la procédure	43
Caractérisation de performances	44
Performances analytiques sur des échantillons de référence.....	44
Tableau 1 : récapitulatif des résultats.....	44
Performances analytiques sur une cohorte de patients	45
Répétabilité.....	45
<i>Répétabilité intra-run</i>	45
<i>Répétabilité inter-runs</i>	46
Reproductibilité	47
Sensibilité analytique	47
Bibliographie.....	48
Tableau des symboles.....	49
Notes.....	49

Précautions importantes.

Recommandations générales.

- Utilisable pour le diagnostic *in vitro*
- Respecter les bonnes pratiques de laboratoires relatives aux manipulations de produits de PCR (porter une blouse et des gants jetables, délimiter des zones dédiées pré et post PCR, utiliser des cônes à filtre).
- Prendre également des précautions afin d'éviter les contaminations par des nucléases susceptibles d'induire une dégradation des ARN et des ADN (utiliser des consommables et des réactifs nuclease-free).
- S'assurer que les thermocycleurs sont en bon état de fonctionnement et calibrés suivant les recommandations du constructeur.
- Il est particulièrement important de ne pas substituer les réactifs non fournis dans le kit, en particulier les tampons et enzymes utilisés aux étapes de transcription inverse, ligation et amplification par PCR. Les temps et températures d'incubation ainsi que les volumes et concentrations doivent également être respectés.
- Le kit pour test **SarcomaFusion** contient un contrôle positif interne GAPDH. Il est fortement recommandé de le réaliser pour valider la bonne réalisation de votre expérience.
- Les réactifs **GENEXPATH SarcomaFusion** sont destinés uniquement à une utilisation sur les plateformes de séquençage Miseq ou Nextseq 500/550 d'Illumina.
- Les fiches de données de sécurité sont disponibles sur l'espace utilisateur.
- Si l'utilisateur détecte des erreurs dans les instructions fournies : adressez un e-mail à contact@genexpath.com.
- Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif doit nous être notifié à l'adresse contact@genexpath.com.

Pictogrammes



Points importants et étapes critiques du protocole pouvant compromettre la qualité des résultats.



Etapes où le protocole peut être suspendu.

Utilisation prévue

Ce protocole est destiné à la mise en œuvre du test **GENEXPATH SarcomaFusion**. Il permet de préparer des bibliothèques de séquençage destinées aux séquenceurs Illumina de type MiSeq ou NextSeq 500/550.

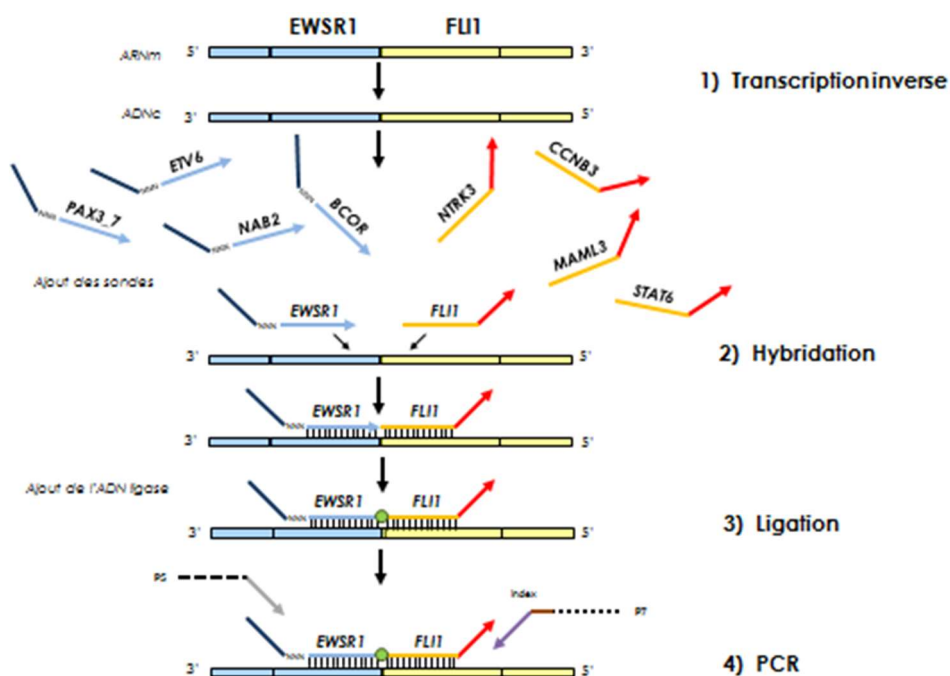
Les fichiers fastQ générés à l'aide de ce test contiennent des données relatives au comptage de séquences correspondant à la présence éventuelle d'un transcrit de fusion, c'est-à-dire à la ligation de deux sondes et à leur amplification.

Ils sont analysables grâce au logiciel **GENEXPATH RT-MIS** qui héberge une application de démultiplexage de séquences spécifique.

Ce test permet, par l'étude de 138 gènes, la détection de transcrits de fusion retrouvés dans 58 types de tumeurs des os et des tissus mous.

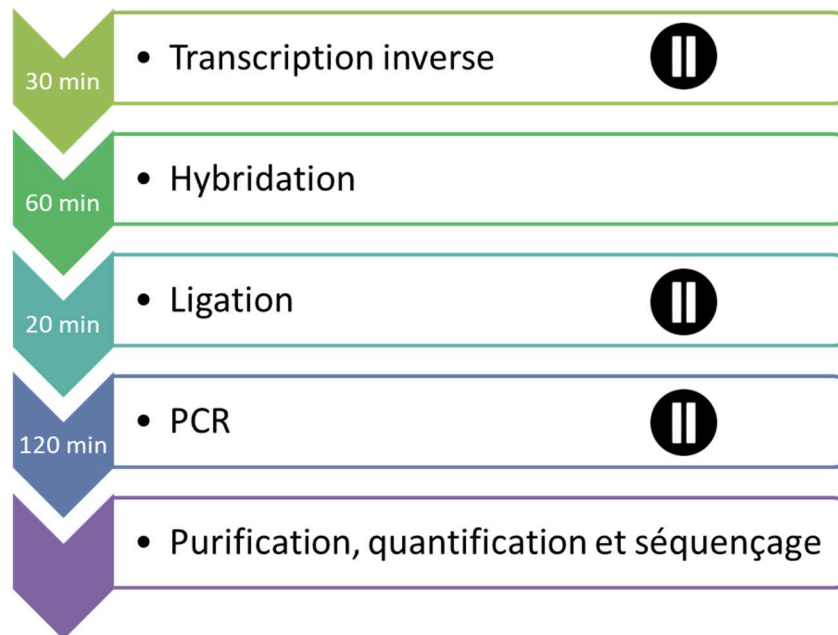
Principe du test.

Le test **GENEXPATH SarcomaFusion** repose sur une méthode de RT-PCR dépendante de ligation (LD-RT-PCR). Cette technique semi-quantitative permet de détecter des translocations chromosomiques à l'aide de couples de sondes oligo-nucléotidiques spécifiques. Un couple de sondes pour un gène de contrôle (GAPDH) est inclus dans le mix de sondes du test permettant ainsi de réaliser un contrôle interne à votre expérience.



A partir d'un extrait d'ARN total, quatre étapes sont suffisantes pour obtenir les librairies.

- Une étape de transcription inverse (RT).
- Une étape d'hybridation des sondes oligo-nucléotidiques spécifiques.
- Une étape de ligation.
- Une étape d'amplification par PCR.



Aucune purification n'est nécessaire jusqu'à l'obtention des librairies, ce qui limite les pertes de matériel et assure une très bonne sensibilité à cette technique. De plus, les séquences génétiques ciblées par les sondes sont particulièrement courtes (entre 40 et 60 bases) ce qui assure une très bonne robustesse vis-à-vis de la dégradation des ARN.

La LD-RT-PCR est donc une approche particulièrement adaptée à l'analyse d'échantillons biologiques difficiles comme les biopsies tissulaires fixées et incluses en paraffine.

Pour chaque échantillon, environ 10^5 séquences sont suffisantes pour obtenir un profil d'expression analysable, ce qui permet de tester un grand nombre d'échantillons en parallèle sur une même FlowCell de séquençage. Les librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** peuvent également être chargées en même temps que d'autres librairies de séquençage, générées par d'autres méthodes.

Réactifs.

Contenu du kit de réactifs GENEXPATH SarcomaFusion.

Mix de sondes GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-SFPM
Barcodes GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-BC-xxx
Amorce de séquence GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-SP-001
Barcodes GAPDH GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-BCC-xxx
Amorce de séquence GAPDH GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-SP-002

XXX : n° de barcode

A réception, ces réactifs doivent être conservés entre -30°C et -15°C.

Ils sont prêts à l'emploi et n'ont pas besoin d'être dilués.

La durée de vie des réactifs est de 1 an.

Remettre dans les conditions de stockage immédiatement après utilisation.

Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Format des kits de réactifs commercialisés et quantités :

	Kit de réactifs - U = nombre d'analyses			
	8U	16U	24U	48U
Mix de sondes GEP-SFPM	30 µL	48 µl	54 µl	108 µL
Barcodes GEP-BC-xxx (de 001 à 032 en fonction du nombre d'analyses achetées) BC=barcode	8 BC	8 BC	12 BC	24 BC
	N°017 à 024	N°001 à 008	N°021 à 032	N°001 à 024
	5µL/BC	8µL/BC	6µL/BC	6µL/BC
Amorces de séquence GEP-SP-001	96 µL	144 µL	180 µL	360 µL
Pour le contrôle interne				
Barcodes GAPDH GEP-BCC-xxx (de 001 à 032 en fonction du nombre d'analyses achetées) BCC=barcode de contrôle	8 BCC	8 BCC	12 BCC	24 BCC
	N°017 à 024	N°001 à 008	N°021 à 032	N°001 à 024
	5µL/BCC	8µl/BCC	6µL/BCC	6µL/BCC
Amorces de séquence GAPDH GEP-SP-002	96 µL	144 µL	180 µL	360 µL

Les réactifs sont fournis en quantité plus importante que le besoin réel. A l'issue du nombre d'analyses commandées, ils doivent être jetés. Si une nouvelle commande est passée, les réactifs seront livrés en conséquence.

Pour un kit de réactifs de plus de 8 analyses, chaque barcode sera à utiliser pour 2 analyses différentes.

Réactifs non fournis dans le kit de réactifs :

Réactifs	Fournisseurs et références
SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, ref 11754250
SALSA MLPA Buffer	MRC Holland, ref SMR33
SALSA Ligase Buffer A	MRC Holland, ref SMR12
SALSA Ligase Buffer B	MRC Holland, ref SMR13
SALSA Ligase 65	MRC Holland, ref SMR20
Red'y' Star PCR Mix	Eurogentec, ref PK-0073-02R
AMPure XP (billes magnétiques)	Beckman Coulter, ref A63880
Qubit® dsDNA HS Assay	Fisher Scientific, ref 10616763
Réactifs de séquençage	Illumina
Tampon TE (10 mM Tris-Acetate pH 8.0, 1 mM EDTA)	Variable
Ethanol 100%	Variable
NaOH 1 N	Variable
Tris Buffer 200 mM pH 7	Variable
Eau Nuclease Free	Variable

A réception et entre chaque utilisation, ces réactifs doivent être conservés en suivant les recommandations des différents fournisseurs.

Matériels nécessaires :

Matériel	Fournisseurs et références
Thermocycleur en zone pré-PCR	Variable
Thermocycleur en zone post-PCR	Variable
Qubit® Fluorometer (ou équivalent)	Thermo Fisher Scientific, ref Q33238
Qubit® Assay Tubes	Fisher Scientific, ref 12037609
DynaMag™-96 Side Magnet - Plaque aimantée (purification AMPure XP)	Thermo Fisher Scientific, ref 12331D
Tubes et plaques PCR 200 µL	Variable

Avant de commencer.

Echantillons biologiques.

Le test **GENEXPATH SarcomaFusion** permet de préparer des bibliothèques de séquençage à partir d'ARN totaux extraits de tissus ou de biopsies tumorales de sarcomes (tumeurs des os et tissus mous).

Ces échantillons peuvent être frais, congelés ou fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE).

Pour l'extraction des ARN à partir de tissus fixés, il est recommandé d'utiliser le kit Promega Maxwell® RSC RNA FFPE (Promega, ref AS1440 et AS4500).

La quantité d'ARN à analyser doit être comprise entre **50 et 500 ng, dans un volume de 2,5 µL**. Si la concentration des solutions à analyser est trop élevée, ces ARN peuvent être dilués en eau nuclease free.

Programmation des Thermocycleurs.

Pour limiter les risques de contamination, utiliser deux thermocycleurs, un en zone pré-PCR et un en zone post-PCR.

Deux programmes sont nécessaires :

- Le premier permet de réaliser les trois premières étapes du protocole : **transcription inverse des ARN en ADNc, hybridation des sondes oligo-nucléotidiques et ligation**. Il doit être mis en œuvre dans le thermocycleur situé en zone pré-PCR.
- Le second permet d'amplifier les produits de ligation et d'incorporer les barcodes et adaptateurs nécessaires au séquençage. Il doit être mis en œuvre dans le thermocycleur situé en zone post-PCR.

Programme 1 : Pré PCR.



Les volumes réactionnels étant faibles, s'assurer que la température du couvercle chauffant du thermocycleur reste à un niveau élevé (95°C) à toutes les étapes du programme pour éviter l'évaporation.

Des plages de pauses à 4°C ou 54°C sont prévues entre les différentes étapes du programme pour permettre l'ajout des réactifs nécessaires.

Etape 1 : Transcription inverse des ARN en ADNc.

- Couvercle chauffant : 95°C
- 10 minutes 25°C
- 60 minutes à 42°C
- 5 minutes 85°C
- 4°C infini

Etape 2 : Hybridation des sondes.

- Couvercle chauffant : 95°C
- 2 minutes 95°C
- 60°C infini (1h d'hybridation)

Etape 3 : Ligation.

- Couvercle chauffant : 95°C
- 54°C infini (distribution du mix de ligation)
- 15 minutes 54°C
- 5 minutes 98°C
- 4°C infini

Programme 2 : PCR.

- Couvercle chauffant : 95°C
- 6 minutes 94°C
- 35 x (30 secondes 94°C ; 30 secondes 58°C ; 30 secondes 72°C)
- 4 minutes 72°C
- 4°C infini

Protocole détaillé.**Etape 1 : Transcription inverse.**

Cette étape doit être réalisée en zone pré-PCR.

Réactifs nécessaires.

- 5X Vilo reaction mix, 10X super script (SuperScript Vilo cDNA Synthesis Kit), eau nucléase free, extrait d'ARN totaux à tester (25 à 250 ng/ µL).



Il est recommandé de réaliser l'ensemble de la procédure dans des tubes ou des plaques de PCR de 200 µL.

Transcription inverse.

- Décongeler les réactifs suivants puis les conserver sur la glace ou sur un portoir réfrigérant : 5X Vilo reaction mix et 10X super script.
- Préparer un mix de transcription inverse. Pour chaque échantillon, mélanger (pour un volume total de 3 µL par réaction) :
 - 5X Vilo reaction mix 1 µL
 - Eau nucléase free 1 µL
 - 10X super script 0,5 µL
- Distribuer ce mix dans des tubes PCR de 200 µL (2,5 µL par tube) conservés sur la glace ou sur un portoir réfrigérant.

- Ajouter 2,5 µL de chacune des solutions d'ARN total dans les différents tubes.
- Vortexer, centrifuger brièvement.
- Placer les tubes dans le thermocycleur situé en zone pré-PCR et procéder à l'**étape 1 du programme Pré-PCR** (Transcription inverse des ARN en ADNc).



Procéder ensuite directement à l'étape 2 ou conserver les produits de ligations entre -30°C et -15°C.

Etape 2 : Hybridation des sondes.

Cette étape doit être réalisée en zone pré-PCR.

Réactifs nécessaires.

- Mix de sondes **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP- SFPM), SALSA MLPA Buffer

Hybridation des sondes.

- **A l'issue de l'étape 1**, lorsque la température du thermocycleur est redescendue à 4°C, sortir les tubes, les centrifuger brièvement, et les placer sur la glace ou sur un portoir réfrigérant.
- Décongeler le tampon Salsa MLPA buffer et le Mix de sondes **GENEXPATH SarcomaFusion**, puis les conserver sur la glace ou sur un portoir réfrigérant.
- Préparer un mix d'hybridation. Pour chaque échantillon, mélanger (pour un volume total de 3 µL par réaction) :
 - Salsa MLPA Buffer 1,5 µL
 - Mix de sonde **GENEXPATH SarcomaFusion** 1,5 µL
- Vortexer, centrifuger brièvement.
- Ajouter 3 µL de ce mix dans chacun des tubes d'ADNc.
- Centrifuger brièvement.
- Replacer les tubes dans le thermocycleur.
- Vérifier la température du couvercle chauffant (95°C).
- Procéder à l'**étape 2 du programme pré-PCR** (hybridation des sondes).

Etape 3 : Ligation.

Cette étape doit être réalisée en zone pré-PCR.

Réactifs nécessaires.

- SALSA Ligase Buffer A, SALSA Ligase Buffer B, SALSA Ligase 65, Eau nuclease free.

Ligation.

- 15 minutes avant la fin de l'étape 2, décongeler les tampons SALSA Ligase Buffer A et SALSA Ligase Buffer B et les conserver sur la glace ou sur un portoir réfrigérant.
- Placer l'enzyme SALSA ligase 65 sur la glace ou sur un portoir réfrigérant.
- Préparer un mix de ligation. Pour chaque échantillon, mélanger (pour un volume total de 32 µL par réaction) :
 - Eau nuclease free 25 µL
 - Salsa Ligase Buffer A 3 µL
 - Salsa Ligase Buffer B 3 µL
- Vortexer, centrifuger brièvement
 - Salsa Ligase 65 1 µL
- Vortexer, centrifuger brièvement.
- A l'issue des 60 minutes d'incubation, procéder à **l'étape 3 du programme pré-PCR (ligation)**.
- Abaisser la température du bloc chauffant à 54°C.
- Ajouter 32 µL du mix de ligation directement dans chaque tube, sans les sortir du bloc chauffant.
- Après distribution du mix, procéder à l'étape suivante du programme (15 minutes à 54°C, 5 minutes à 98°C).



A l'issue de cette étape, lorsque la température du bloc PCR est redescendue à 4°C procéder immédiatement à l'étape 4 (amplification par PCR) ou congeler les produits de ligations (entre -30°C et -15°C).



Après cette étape, ne pas conserver les produits à des températures plus élevées (par exemple 4°C ou à température ambiante) afin d'éviter les ligations non spécifiques qui pourraient résulter d'une activité résiduelle de l'enzyme.

Etape 4 : Amplification et incorporation des barcodes et adaptateurs.

A cette étape, les produits de ligation sont amplifiés par PCR grâce aux queues additionnelles présentes aux extrémités des sondes. Ces amplifications sont réalisées à l'aide de couples d'amorces fournis dans les tubes de Barcodes **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BC-xxx).

Pour permettre l'analyse de plusieurs échantillons sur une même FlowCell, l'amorce de PCR 3' porte un barcode moléculaire qui sera reconnu par l'algorithme de démultiplexage de la plateforme **GENEXPATH RT-MIS**.

Pour réaliser le contrôle interne avec les sondes GAPDH, deux PCR différentes sont réalisées, il faut donc dupliquer votre nombre de tubes. Pour un échantillon donnée, il faut utiliser le même numéro xxx de barcodes GEP-BC-xxx et GEP-BCC-xxx pour l'analyse informatique. Donc il faut ajouter, pour chaque échantillon, dans un tube le barcode GEP-BC-xxx et dans l'autre le barcode GEP-BCC-xxx associé.

Réactifs nécessaires.

- Barcodes **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BC-xxx), Barcodes GAPDH **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BCC-xxx), Red'y' Star PCR Mix, eau nuclease free.

Amplification.

- Préparer un mix d'amplification en zone pré-PCR. Pour chaque échantillon, mélanger (pour un volume total de 18 µL par réaction) :
 - Red'y' Star PCR Mix 12,5 µL
 - Eau nuclease free 5,5 µL
- Vortexer, centrifuger brièvement.
- Distribuer 18 µL de ce mix d'amplification dans différents puits d'une plaque PCR.
- Ajouter 5 µL des produits de ligation générés à l'étape 3 dans chacun des puits.
- Ajouter 2 µL de Barcode **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BC-xxx ou GEP-BCC-xxx selon le test).



Utiliser des barcodes BEP-BC-xxx différents pour chacun des échantillons testés mais pour un même échantillon, utiliser le même numéro pour BEP-BC-xxx et GEP-BCC-xxx.

- Placer la plaque dans le thermocycleur en zone post-PCR.
- Lancer le **programme 2** (PCR).



A la fin du programme, lorsque la température du thermocycleur est redescendue à 4°C, procéder rapidement à l'étape 5 (Purification) ou congeler les produits d'amplification entre -30°C et -15°C.



Ne pas conserver ces produits de façon prolongée à des températures plus élevées (par exemple 4°C dans le thermocycleur ou à température ambiante).

Etape 5 : Purification et dosage des librairies de séquençage.

A l'issue de l'étape d'amplification, les librairies de séquençage doivent être purifiées pour éliminer les amorces de PCR et les nucléotides non incorporés. Cette purification est réalisée à l'aide de billes magnétiques AMPure XP. Les librairies doivent ensuite être dosées par fluorimétrie avec le kit Qubit® dsDNA HS avant chargement sur le séquenceur.

Réactifs nécessaires.

- Ethanol 100%, eau nucléase free, billes AMPure XP, tampon TE (10 mM Tris-Acetate pH 8.0, 1 mM EDTA), Qubit® dsDNA HS Assay.

Etape 5.a : Purification des librairies de séquençage.



S'assurer que les billes sont complètement re-suspendues avant utilisation.

- Purifier 25 µL de produits de PCR avec 45 µL de billes AMPure XP (en suivant les recommandations du fournisseur).
- Eluer les produits de PCR purifiés dans 50 µL de tampon TE.



Après purification, les librairies peuvent être conservées entre -30°C et -15°C avant séquençage.

Etape 5.b : Dosage des librairies de séquençage.

- Doser 10 µL de chaque librairie de séquençage par fluorimétrie grâce au Qubit® dsDNA HS Assay.

Etape 6 : Dilution, pool et séquençage des librairies.

Après purification, les librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** doivent être diluées, regroupées et chargées sur le séquenceur.



Pour obtenir des résultats optimaux, un minimum de 10⁵ séquences doivent être lues pour chaque échantillon.

Contrairement à la plupart des librairies de séquençage classiques, la read des barcodes moléculaires nécessaire au démultiplexage des séquences **GENEXPATH SarcomaFusion** se fait en cours de read1. Ces séquences ne sont donc pas démultiplexées automatiquement par le séquenceur et seront sauvegardées dans les fichiers fastQ « Undetermined ». Le démultiplexage est réalisé grâce à l'algorithme spécifique mis à disposition sur la plateforme **GENEXPATH RT-MIS**.

Réactifs nécessaires.

- Amorce de séquençage **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001), amorces de séquençage de contrôle **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-002) (si contrôle interne réalisé), réactifs de séquençage Illumina.

Séquençage sur un séquenceur Illumina MiSeq.

Pour des informations détaillées relatives à la dilution et à la dénaturation des librairies, à la préparation du primer de séquence, à la feuille d'injection et au lancement du séquençage, se référer au guide Illumina du système Miseq.

• *Etape 6.a : Dilution et pool des librairies.*

- Diluer chacune des librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** à une concentration comprise entre 2 nM et 4 nM, en considérant une taille moyenne de fragments amplifiés de 150 pb.
- Regrouper les librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** en équivolume.
- Si d'autres librairies sont séquencées sur la même flowcell, ajuster les concentrations des différents pools puis les combiner pour obtenir les nombres de séquences désirées (minimum 10^5 séquences pour chaque librairie **GENEXPATH SarcomaFusion**).

Exemple : Pour un pool de 10 librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** nécessitant 1 M de séquences (10^5 séquences pour chaque librairie), séquencé avec un pool de librairies B à la même concentration et nécessitant 3 M de séquences, mélanger 1 μ L du pool de librairies **GENEXPATH Sarcoma Fusion** et 3 μ L du pool de librairies B.

• *Etape 6.b : Dénaturation et dilution du pool de librairies.*

- Dénaturer et diluer le pool final en suivant les recommandations du guide Illumina du système Miseq, pour obtenir une concentration finale de chargement entre 8 à 10 pM.

• *Etape 6.c : Préparation des amorces de séquençage.*

- Si le pool de librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** est séquencé seul, diluer 3 μ L de chaque amorce de séquençage **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 et GEP-SP-002, si contrôle interne) dans un volume final de 600 μ L de tampon HT1, puis déposer ces 600 μ L dans le puits 18 de la cartouche de réactifs du MiSeq.
- Si le pool de librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** est chargé avec d'autres librairies séquencées à l'aide des amorces de séquençage Illumina, pipeter la totalité du contenu du puits 12 (environ 600 μ L), ajouter 3 μ L de chaque amorce de séquençage **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 et GEP-SP-002, si contrôle interne) puis redéposer ce mix dans le puits 18 de la cartouche.

- **Etape 6.d : Préparation de la feuille d'injection.**

- Si la librairie **GENEXPATH SarcomaFusion** est séquencée seule, réaliser la feuille d'injection pour générer les FASTQ en prévoyant 120 cycles en read 1.
- Si les librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** sont combinées à d'autres librairies de séquençage, générer la feuille d'injection en utilisant les paramètres habituels, sans renseigner les échantillons **GENEXPATH SarcomaFusion**.
- Spécifier l'utilisation de custom lors de la configuration du run (Avec Local Run Manager, sur la page Create Run. En mode run manuel, sur l'écran Run Setup).



Dans tous les cas, veiller à ce que la read en read 1 se fasse avec un minimum de 120 cycles et que la case Custom Primer for Read 1 soit sélectionnée.

- Dans tous les cas, les séquences des librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** ne seront pas démultiplexées par le séquenceur mais seront enregistrées dans le fichier FastQ « Undetermined », qui devra être ensuite chargé sur la plateforme **GENEXPATH RT-MIS**.

- **Etape 6.e : Lancement du séquençage.**

- Lancer le séquençage en suivant la procédure décrite dans le guide Illumina du système MiSeq.

Séquençage sur une plateforme NextSeq 500/550 Illumina.

Pour des informations détaillées relatives à la dilution et à la dénaturation des librairies, à la préparation du primer de séquence, à la feuille d'injection et au lancement du séquençage, se référer au guide Illumina du système NextSeq.

- **Etape 6.a : Dilution et pool des librairies.**

- Diluer chacune des librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** à une concentration comprise entre 0.5 nM et 4 nM, en considérant une taille moyenne de fragments amplifiés de 150 pb.
- Regrouper les librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** en équivolume.
- Si d'autres librairies sont séquencées sur la même flowcell, ajuster les concentrations des différents pools puis les combiner pour obtenir les nombres de séquences désirées (minimum 10^5 séquences pour chaque librairie **GENEXPATH SarcomaFusion**).

Exemple : Pour un pool de 10 librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** nécessitant 1 M de séquences (10^5 séquences pour chaque librairie), séquencé avec un pool de librairies B à la même concentration et nécessitant 3 M de séquences, mélanger 1 μ L du pool de librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** et 3 μ L du pool de librairies B.

- **Etape 6.b : Dénaturation et dilution du pool de librairies.**

- Dénaturer et diluer le pool final en suivant les recommandations du guide Illumina du système NextSeq, pour obtenir une concentration finale de chargement de 0.8 pM à 1 pM.

- **Etape 6.c : Préparation des amorces de séquençage.**

- Si le pool de librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** est séquençé seul, diluer 6 µL de chaque amorce de séquençage **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 et GEP-SP002, si contrôle interne) dans un volume final de 2000 µL de tampon HT1 puis déposer ces 2 mL dans le puits 7 de la cartouche de réactifs du NextSeq.
- Si le pool de librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** est combiné avec d'autres librairies séquençées à l'aide des amorces de séquençage Illumina, pipeter la totalité du contenu du puits 20 (environ 2 mL), ajouter 6 µL de chaque amorce de séquençage **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 et GEP-SP-002, si contrôle interne) puis redéposer ce mix dans le puits 7 de la cartouche.

- **Etape 6.d : Préparation de la feuille d'injection.**

- Si la librairie **GENEXPATH SarcomaFusion** est séquençée seule, réaliser la feuille d'injection pour générer les FASTQ en prévoyant 120 cycles en read 1.
- Si les librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** sont combinées à d'autres librairies de séquençage, générer la feuille d'injection en utilisant les paramètres habituels, sans renseigner les échantillons **GENEXPATH SarcomaFusion**.
- Spécifier l'utilisation de custom lors de la configuration du run (Avec Local Run Manager, sur la page Create Run. En mode run manuel, sur l'écran Run Setup).



Dans tous les cas, veiller à ce que la read en read 1 se fasse avec un minimum de 120 cycles et que la case Custom Primer for Read 1 soit sélectionnée.

- Dans tous les cas, les séquences des librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** ne seront pas démultiplexées par le séquenceur mais seront enregistrées dans les quatre fichiers FastQ « Undetermined », qui devront être ensuite chargés sur la plateforme **GENEXPATH RT-MIS**.

- **Etape 6.e : Lancement du séquençage.**

- Lancer le séquençage en suivant la procédure décrite dans le guide Illumina du système NextSeq.

Etape 7 : Analyse des résultats.

Les fichiers de séquences générés par plateforme de séquençage Illumina (MiSeq ou NextSeq), au format FastQ, doivent ensuite être analysés grâce au logiciel **GENEXPATH RT-MIS** disponible en ligne à l'adresse suivante : <https://connect.genexpath.com/>.



Afin de faciliter le téléchargement du fichier FastQ, celui-ci ne doit pas être décompressé (fastq.gz).

Ce logiciel est une solution bio-informatique complète qui intègre différents algorithmes de traitement de données. Il réalise le démultiplexage permettant l'attribution des séquences à chaque échantillon. Il réalise ensuite une identification précise des marqueurs d'expression génique et leur quantification.

Le test **GENEXPATH SarcomaFusion** repose sur une quantification de marqueurs qualitatifs caractérisant la présence ou absence de translocations chromosomiques.

GENEXPATH RT-MIS génère des rapports concis et transparents allant de la mise en place des réactions de séquençage jusqu'à l'analyse automatisée des résultats de séquençage.

GENEXPATH RT-MIS nécessite le chargement des fichiers du séquenceur au format FASTQ ainsi que la liste des barcodes utilisés lors de l'expérimentation.

GENEXPATH RT-MIS évalue la qualité du séquençage de chaque échantillon en quantifiant le nombre de reads identifiées et le nombre d'UMI (unique molecular identifier) détectés.

GENEXPATH RT-MIS génère pour chaque échantillon un rapport d'analyse indiquant la présence ou non d'un transcrit de fusion, le nombre de reads et d'UMI obtenus ainsi qu'une référence bibliographique correspondant au transcrit (dans le cas où une fusion a été détectée). Ces données sont disponibles au téléchargement.

GENEXPATH RT-MIS intègre un manuel utilisateur directement accessible en ligne pour faciliter la prise en main de l'outil, pour décrire l'ensemble des résultats générés et pour détailler la présentation des résultats.

L'entreprise **GENEXPATH** ne stocke pas de manière durable les résultats générés par le logiciel **GENEXPATH RT-MIS**. Les données doivent être téléchargées directement après chaque analyse et stockées par l'utilisateur dans son système de gestion documentaire.

Limites de la procédure

- Le test SarcomaFusion a été développé à partir des données de la littérature pour détecter les transcrits de fusion les plus fréquents chez des patients atteints d'un sarcome. Il est destiné à être utilisé sur des échantillons FFPE ou congelés, possiblement obtenus à partir de biopsies à l'aiguille.

- Les performances démontrées dans le paragraphe « Caractérisation des performances » ont été validées selon les instructions décrites ci-dessus.

- Une faible quantité d'ARN ou un échantillon de faible qualité peut engendrer un résultat ininterprétable.

- Le séquençage doit être réalisé avec des séquenceurs de la technologie Illumina (Miseq et NextSeq).

Caractérisation de performances

Performances analytiques sur des échantillons de référence

Pour démontrer les performances analytiques du test SarcomaFusion, c'est-à-dire sa capacité à détecter les translocations, plusieurs échantillons de référence ont été analysés :

- 4 ARN extraits à partir d'échantillons FFPE (3 positifs et 1 négatif)
- 3 ARN extraits à partir d'échantillons congelés (tous positifs)
- 2 lignées cellulaires (toutes négatives)

Les échantillons positifs désignent des échantillons pour lesquels les fusions étaient connues et validées. Ces échantillons ont été analysés selon la procédure décrite dans cette notice d'utilisation et les résultats du test SarcomaFusion sont reportés dans le tableau 1.

Tableau 1 : récapitulatif des résultats

Echantillon	Résultat attendu / <i>obtenu</i>	Valeurs prédictives	
Echantillon 1	EWSR1 exon 7 - CREB1 exon 7 <i>EWSR1 exon 7 - CREB1 exon 7</i>	Vrai positif (VP)	6
Echantillon 2	JAZF1 exon 3 - SUZ12 exon 2 <i>JAZF1 exon 3 - SUZ12 exon 2</i>	Vrai négatif (VN)	3
Echantillon 3	PAX3_7 exon 7 - FOXO exon 2 <i>PAX3_7 exon 7 - FOXO exon 2</i>	Valeur prédictive positive (%)	100%
Echantillon 4	Négatif <i>Absence d'anomalie détectée</i>	Rappel (%)	100%
Echantillon 5	SS18 exon 10 – SSX exon6 <i>SS18 exon 10 – SSX exon6</i>	Taux faux positif (%)	0%
Echantillon 6	PAX3_7 exon 7 – FOXO exon 2 <i>PAX3_7 exon 7 – FOXO exon 2</i>	Sensibilité (%)	100%
Echantillon 7	EWSR1 exon 7 – FLI1 exon 6 <i>EWSR1 exon 7 – FLI1 exon 6</i>	Faux positif (FP)	0
Lignée cellulaire 1	Négatif <i>Absence d'anomalie détectée</i>	Faux négatif (FN)	0

Lignée cellulaire 2	Négatif <i>Absence d'anomalie détectée</i>	Valeur prédictive négative (%)	100%
		Précision (%)	100%
		Taux faux négatif (%)	0%
		Spécificité (%)	100%

Les résultats démontrent que le test SarcomaFusion fournit une haute sensibilité et spécificité pour la détection de transcrits de fusion associés au sarcome.

Performances analytiques sur une cohorte de patients

Une étude publiée en 2022 sur 158 échantillons de tumeurs osseuses et de tissus mous (Lanic MD et al., Modern Pathology, 2022) a démontré les performances suivantes :

- Sensibilité = 98.1%
- Spécificité = 100 %

Dans cet article, les auteurs rapportent que les quelques anomalies non détectées par le test SarcomaFusion sont expliquées par :

- La présence de translocations rares ou complexes non couvertes par le test SarcomaFusion
- La faible qualité et quantité d'ARN de quelques échantillons

Répétabilité

La répétabilité du test SarcomaFusion est définie comme sa capacité à quantifier avec précision un transcrit de fusion attendu. Deux tests ont été réalisés :

- Un test permettant de tester la répétabilité des résultats de 3 échantillons au sein d'un même run
- Un second permettant de tester la répétabilité des résultats de 5 échantillons sur 3 runs différents

Répétabilité intra-run

3 échantillons analysés en triplicata par le test SarcomaFusion ont été étudiés (Figure 1). Les données de comptage de chaque anomalie en fonction des répliques sont parfaitement comparables.

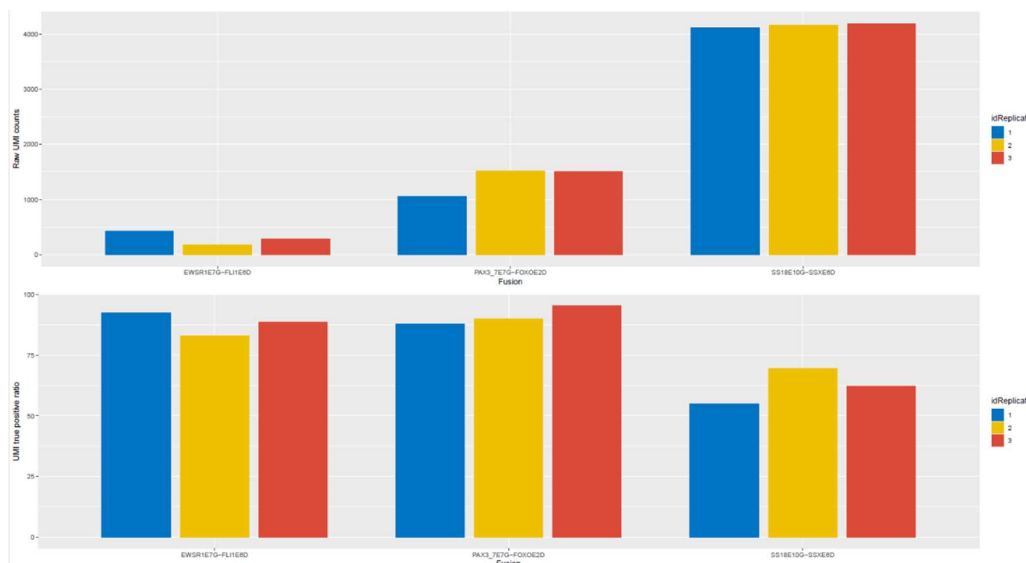


Figure 1 : Les histogrammes représentent en haut le nombre brut d'UMI détectés et en bas celui-ci rapporté au nombre total d'UMI de l'échantillon en fonction de la fusion attendue et des réplicas.

Répétabilité inter-runs

5 échantillons analysés par le test SarcomaFusion ont été étudiés sur 3 runs différents (Figure 2). Les données de comptage de chaque anomalie sont parfaitement comparables.

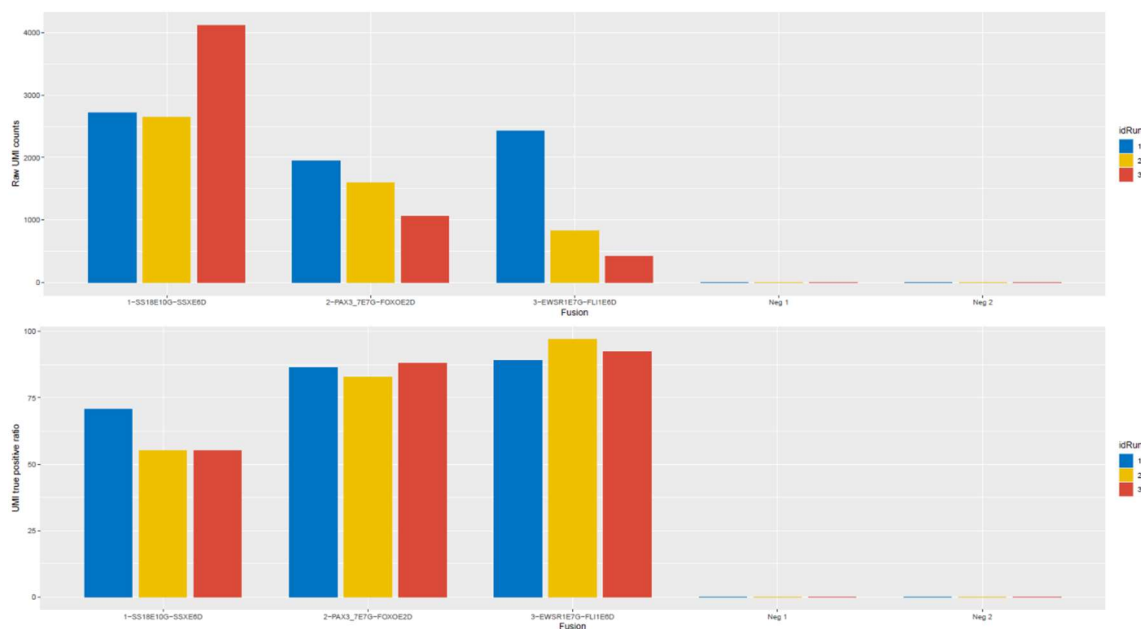


Figure 2 : Les histogrammes représentent en haut le nombre brut d'UMI détectés et en bas celui-ci rapporté au nombre total d'UMI de l'échantillon en fonction de la fusion attendue et du run.

Reproductibilité

La reproductibilité désigne la capacité du test SarcomaFusion à détecter dans des conditions identiques des translocations entre différents utilisateurs.

Afin d'évaluer ce paramètre, 5 échantillons ont été analysés par 3 utilisateurs différents :

- 3 échantillons positifs (SS18 exon 10 – SSX exon6, PAX3_7 exon 7 – FOXO exon 2, EWSR1 exon 7 – FLI1 exon 6)
- 2 échantillons négatifs (lignées cellulaires)

Les données, représentées sur la Figure 3, montrent une quantification reproductible entre les différents utilisateurs.

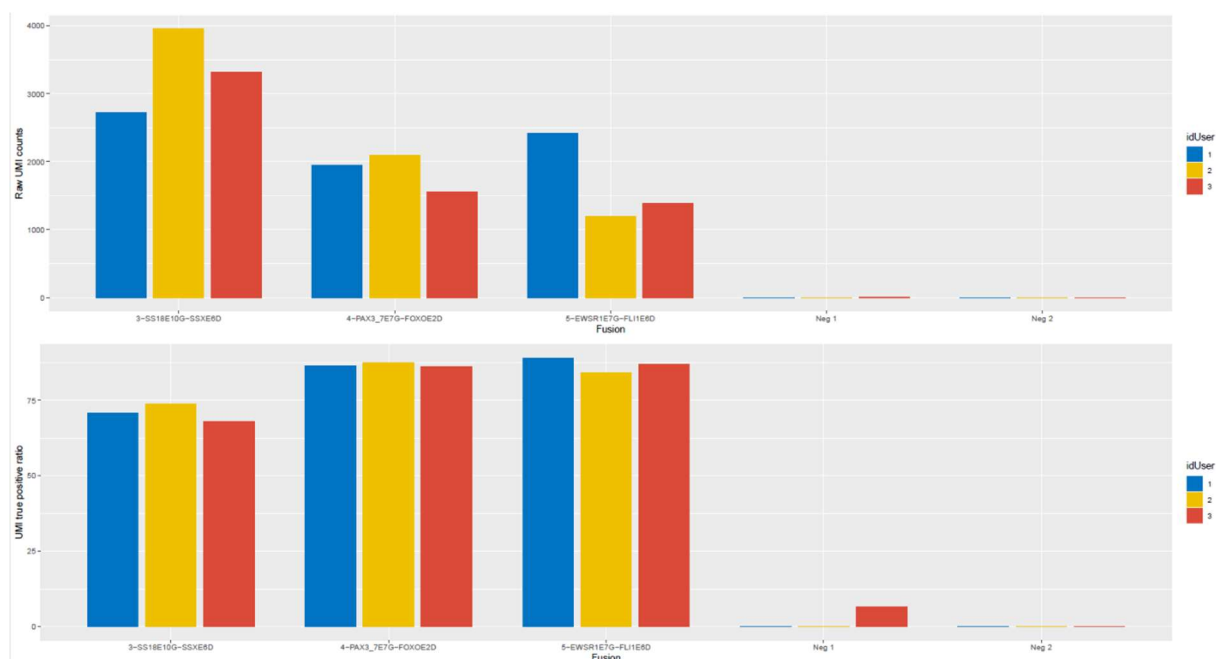


Figure 3 : Les histogrammes représentent en haut le nombre brut d'UMI détectés et en bas celui-ci rapporté au nombre total d'UMI de l'échantillon en fonction de la fusion attendue et de l'utilisateur.

Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du test SarcomaFusion est définie comme étant sa capacité à détecter des translocations en fonction de la quantité d'ARN de l'échantillon et du pourcentage de cellules tumorales de l'échantillon.

Afin de déterminer ces deux limites de sensibilité, deux dilutions sériees ont été réalisées à partir de 2 échantillons :

- Une dilution dans de l'eau afin de simuler une baisse de quantité d'ARN

- Une dilution de l'échantillon à tester dans de l'ARN universel afin de simuler une baisse de l'enrichissement tumoral

Les résultats sont rapportés sur la Figure 4.

La dilution de deux échantillons témoins à des quantités initiales de 529 et 489 ng d'ARN dans de l'eau nuclease free montre que les fusions attendues sont toujours détectées à des quantités d'ARN de 4 ng. Même si la quantification des anomalies est fonction de l'enrichissement tumoral de l'échantillon testé, la limite obtenue est bien en deçà des préconisations d'utilisation du test SarcomaFusion (entre 50 et 500 ng).

La deuxième gamme de dilutions réalisée à partir de deux échantillons positifs et d'ARN universel montre que les anomalies attendues sont toujours détectées à 3% d'échantillon tumoral. A 0% d'ARN positif, le test ne détecte plus aucune trace des fusions.

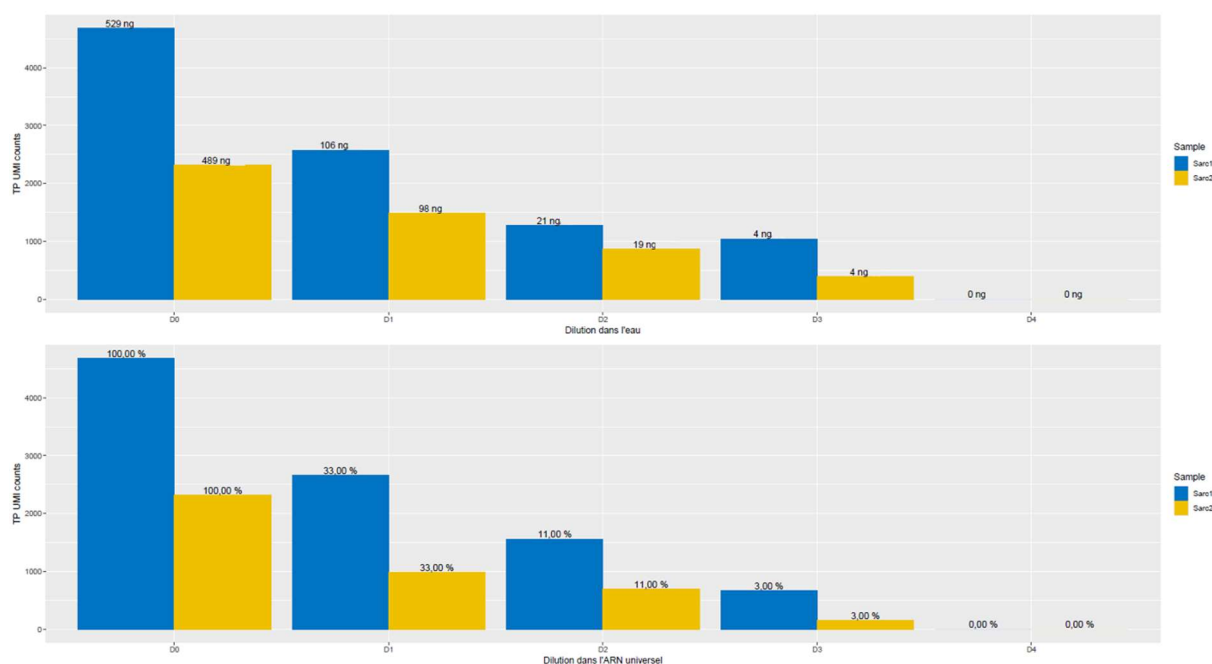


Figure 4 : Les histogrammes représentent le nombre brut d'UMI détectés des fusions attendues dans deux échantillons en fonction des gammes de dilution réalisées dans de l'eau (haut) ou dans de l'ARN universel (bas).

Bibliographie

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).

Tableau des symboles

 Fabricant	 Nom du réactif
 Date de fabrication	 limite de température
 Date limite d'utilisation	 Consulter les instructions d'utilisation
 Code de lot	 Marquage CE – conformité européenne
	 Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>

Notes

Les réactifs **GENEXPATH SarcomaFusion** sont protégés par des droits de propriété intellectuelle et ne peuvent pas être modifiés, reproduits, vendus ou transmis sans autorisation du fabricant.

Les informations contenues dans le présent document sont susceptibles d'être modifiées.



DEUTSCH

Gebrauchsanweisung GENEXPATH SarcomaFusion.

Vorsichtsmaßnahmen für den Gebrauch.



In-vitro-Diagnostikum gemäß Richtlinie (EU) 98/79/EG



Für die Verwendung in der *In-vitro*-Diagnostik

Nur für den professionellen Gebrauch bestimmt.

Lesen Sie vor dem Gebrauch alle Informationen in dieser Anleitung.

Kontakt:

Hersteller: GENEXPATH

+33 (0)2.78.08.98.69

113 avenue des Martyrs de la Résistance

76100 Rouen – Frankreich

contact@genexpath.com

support@genexpath.com

DEUTSCH.....	50
Wichtige Vorsichtsmaßnahmen.	53
Allgemeine Empfehlungen.....	53
Symbole	53
Verwendungszweck.....	54
Testprinzip.....	54
Reagenzien.....	55
Inhalt des GENEXPATH SarcomaFusion Reagenzien-Kits.	55
Format der vermarkteten Reagenzien-Kits und Mengen:.....	56
Nicht im Reagenzien-Kit enthaltene Reagenzien:	56
Benötigte Materialien:	57
Bevor Sie beginnen.	57
Biologische Proben.....	57
Programmierung von Thermocyclern.....	58
Programm 1: Pre-PCR.....	58
Programm 2: PCR.	59
Detailliertes Protokoll.....	59
Schritt 1: Reverse Transkription.....	59
Benötigte Reagenzien.....	59
Reverse Transkription.	59
Schritt 2: Hybridisierung der Sonden.....	60
Benötigte Reagenzien.....	60
Hybridisierung der Sonden.....	60
Schritt 3: Ligation.	60
Benötigte Reagenzien.....	60
Ligation.	60
Schritt 4: Amplifikation und Integration von Barcodes und Adaptern.....	61
Benötigte Reagenzien.....	62
Amplifikation.	62
Schritt 5: Aufreinigung und Dosierung von Sequenzierbibliotheken.	62
Benötigte Reagenzien.....	63

Schritt 5.a: Aufreinigung der Sequenzierbibliotheken.....	63
Schritt 5.b: Dosierung von Sequenzierbibliotheken.	63
Schritt 6: Verdünnung, Poolen und Sequenzierung der Bibliotheken.....	63
Benötigte Reagenzien.....	63
Sequenzierung in einem Illumina MiSeq-Sequenziergerät.....	63
• Schritt 6.a: Verdünnung und Poolen von Bibliotheken.....	64
• Schritt 6.b: Denaturierung und Verdünnung des Bibliothekspools.	64
• Schritt 6.c: Vorbereitung der Sequenzierungsprimer.	64
• Schritt 6.d: Vorbereitung des Probenblatts.	64
• Schritt 6.e: Starten der Sequenzierung.	65
Sequenzierung in einem Illumina NextSeq 500/550 System.	65
• Schritt 6.a: Verdünnung und Poolen von Bibliotheken.....	65
• Schritt 6.b: Denaturierung und Verdünnung des Bibliothekspools.	65
• Schritt 6.c: Vorbereitung der Sequenzierungsprimer.	66
• Schritt 6.d: Vorbereitung des Probenblatts.	66
• Schritt 6.e: Starten der Sequenzierung.	66
Schritt 7: Analyse der Ergebnisse.....	66
Verfahrensgrenzen	67
Leistungsbestimmung.....	68
Analytische Leistungen	68
Tabelle 1: Zusammenfassung der erwarteten Ergebnisse.....	68
Analytische Leistungen an einer Patientenkohorte.....	69
Wiederholbarkeit	69
Wiederholbarkeits-Zwischenläufe	70
Reproduzierbarkeit	70
Analytische Sensibilität	71
Literatur	72
Symboltabelle	73
Hinweise	73

Wichtige Vorsichtsmaßnahmen.

Allgemeine Empfehlungen.

- Verwendbar für die In-vitro-Diagnostik
- Beachten Sie die gute Laborpraxis für den Umgang mit PCR-Produkten (Tragen eines Laborkittels und von Einweghandschuhen, Abgrenzen von speziellen Pre- und Post-PCR-Bereichen, Verwendung von Filterspitzen).
- Treffen Sie auch Vorsichtsmaßnahmen, um Kontaminationen mit Nukleasen zu vermeiden, die einen Abbau von RNA und DNA induzieren könnten (verwenden Sie nukleasefrei Verbrauchsmaterialien und Reagenzien).
- Darauf achten, dass sich die Thermocycler in funktionstüchtigen Zustand befinden und gemäß den Empfehlungen des Herstellers kalibriert sind.
- Es ist besonders wichtig, dass Sie Reagenzien, die nicht im Kit enthalten sind, nicht austauschen, insbesondere die Puffer und Enzyme, die in den Schritten der reversen Transkription, Ligation und PCR-Amplifikation verwendet werden. Auch die Inkubationszeiten und -temperaturen sowie die Volumina und Konzentrationen müssen beachtet werden.
- Das **SarcomaFusion**-Testkit enthält eine interne GAPDH-Positivkontrolle. Es wird dringend empfohlen, sie durchzuführen, um die korrekte Durchführung Ihres Experiments zu bestätigen.
- Die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Reagenzien sind nur für die Verwendung in den Sequenziersystemen Miseq oder Nextseq 500/550 von Illumina bestimmt.
- Die Sicherheitsdatenblätter sind im Anwenderbereich erhältlich.
- Maßnahmen für den Fall, dass der Anwender Fehler in den von Ihnen bereitgestellten Anweisungen entdeckt: Wenden Sie sich an contact@genexpath.com.
- Alle schwerwiegenden Vorfälle, die im Zusammenhang mit dem Diagnostikum aufgetreten sind, müssen uns gemeldet werden: contact@genexpath.com.

Symbole



Wichtige Punkte und kritische Schritte im Protokoll, die die Qualität der Ergebnisse beeinträchtigen können.



Schritte, in denen das Protokoll ausgesetzt werden kann.

Verwendungszweck

Dieses Protokoll ist für die Durchführung des **GENEXPATH SarcomaFusion**-Tests bestimmt. Es dient zur Vorbereitung von Sequenzierbibliotheken für Illumina-Sequenziergeräte des Typs MiSeq oder NextSeq 500/550.

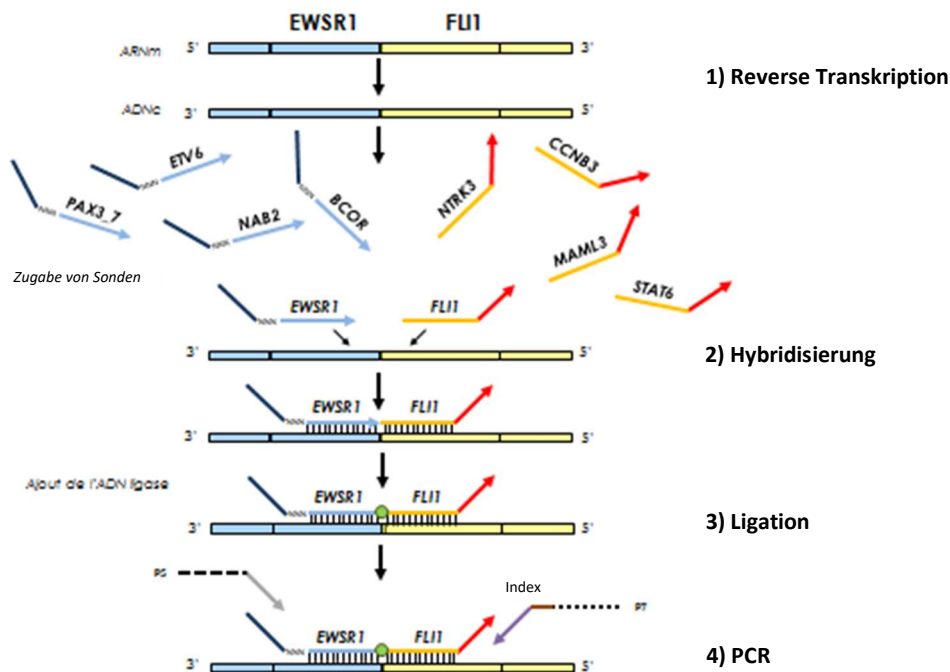
Die mit diesem Test erzeugten fastQ-Dateien enthalten Daten über die Zählung von Sequenzen, die dem möglichen Vorhandensein eines Fusionstranskripts entsprechen, d. h. über die Ligation von zwei Sonden und deren Amplifikation.

Sie können mit der Software **GENEXPATH RT-MIS** analysiert werden, die eine spezielle Sequenzdemultiplex-Anwendung enthält.

Dieser Test ermöglicht durch die Untersuchung von 138 Genen den Nachweis von Fusionstranskripten, die in 58 Arten von Knochen- und Weichgewebstumoren gefunden werden.

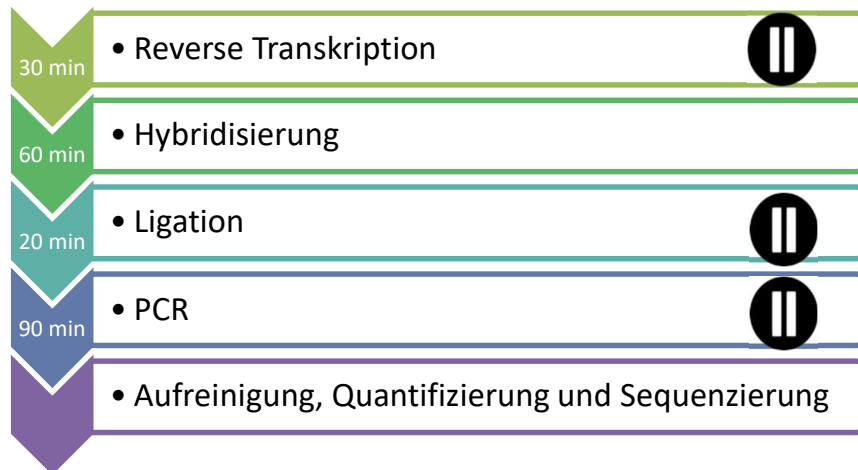
Testprinzip

Der **GENEXPATH SarcomaFusion**-Test basiert auf einer ligationsabhängigen RT-PCR-Methode (LD-RT-PCR). Diese semiquantitative Technik ermöglicht den Nachweis von Chromosomentranslokationen mithilfe spezifischer Oligonukleotid-Sondenpaare. Ein Sondenpaar für ein Kontrollgen (GAPDH) ist im Sonden-Mix des Tests enthalten und ermöglicht so eine interne Kontrolle Ihres Experiments.



Ausgehend von einem RNA-Gesamtextrakt reichen vier Schritte, um die Bibliotheken zu erhalten.

- Ein reverser Transkriptionsschritt (RT).
- Ein Schritt zur Hybridisierung der spezifischen Oligonukleotid-Sonden.
- Ein Ligationsschritt.
- Ein PCR-Amplifikationsschritt.



Bis zum Erhalt der Bibliotheken ist keine Aufreinigung erforderlich, was den Materialverlust begrenzt und eine sehr hohe Sensitivität dieser Technik gewährleistet. Außerdem sind die Ziel-Gensequenzen der Sonden besonders kurz (zwischen 40 und 60 Basen), was eine sehr gute Robustheit gegenüber RNA-Abbau gewährleistet.

Die LD-RT-PCR ist daher ein besonders geeigneter Ansatz für die Analyse schwieriger biologischer Proben wie fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebebiopsien.

Für jede Probe reichen etwa 10^5 Sequenzen aus, um ein analysierbares Expressionsprofil zu erhalten, sodass eine große Anzahl von Proben parallel in einer einzigen FlowCell zur Sequenzierung getestet werden kann. Die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken können auch zusammen mit anderen Sequenzierbibliotheken geladen werden, die mit anderen Methoden erzeugt wurden.

Reagenzien.

Inhalt des GENEXPATH SarcomaFusion Reagenzien-Kits.

Sonden-Mix GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-SFPM
Barcodes GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-BC-xxx
Sequenzstarter GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-SP-001
Barcodes GAPDH GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-BCC-xxx
Sequenzstarter GAPDH GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-SP-002

XXX: Barcode-Nr.

Nach Erhalt müssen diese Reagenzien zwischen -30 °C und -15 °C gelagert werden.

Sie sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden.

Die Haltbarkeit der Reagenzien beträgt ein Jahr.

Sofort nach Gebrauch wieder auf geeignete Lagerbedingungen bringen.

Verwenden Sie die Reagenzien nicht nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatums.

Das Produkt ist bei sachgemäßem Gebrauch bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

Format der vermarkteten Reagenzien-Kits und Mengen:

	Reagenzien-Kit - U = Anzahl der Analysen			
	8U	16U	24U	48U
Sonden-Mix GEP-SFPM	30 µL	48 µL	54 µL	108 µL
Barcodes GEP-BC-xxx (von 001 bis 032, je nach Anzahl der gekauften Analysen) BC=Barcode	8 BC	8 BC	12 BC	24 BC
	Nr. 017 bis 024	Nr. 001 bis 008	Nr. 021 bis 032	Nr. 001 bis 024
	5 µL/BC	8 µL/BC	6 µL/BC	6 µL/BC
Sequenzierungsprimer GEP-SP-001	96 µL	144 µL	180 µL	360 µL
Für die interne Kontrolle				
Barcodes GAPDH GEP-BCC-xxx (von 001 bis 032, je nach Anzahl der gekauften Analysen) BCC=Barcode für die Kontrolle	8 BCC	8 BCC	12 BCC	24 BCC
	Nr. 017 bis 024	Nr. 001 bis 008	Nr. 021 bis 032	Nr. 001 bis 024
	5 µL/BCC	8 µL/BCC	6 µL/BCC	6 µL/BCC
GAPDH-Sequenzierungsprimer GEP-SP-002	96 µL	144 µL	180 µL	360 µL

Reagenzien werden in größeren Mengen bereitgestellt, als tatsächlich benötigt werden. Nach Ablauf der Anzahl der bestellten Analysen müssen sie entsorgt werden. Wenn eine neue Bestellung aufgegeben wird, werden die Reagenzien entsprechend geliefert.

Bei einem Reagenzien-Kit mit mehr als 8 Tests ist jeder Barcode für 2 verschiedene Tests zu verwenden.

Nicht im Reagenzien-Kit enthaltene Reagenzien:

Reagenzien	Lieferant und Art.-Nr.
SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, Art.-Nr. 11754250
SALSA MLPA Buffer	MRC Holland, Art.-Nr. SMR33
SALSA Ligase Buffer A	MRC Holland, Art.-Nr. SMR12
SALSA Ligase Buffer B	MRC Holland, Art.-Nr. SMR13
SALSA Ligase 65	MRC Holland, Art.-Nr. SMR20

Red'y' Star PCR Mix	Eurogentec, Art.-Nr. PK-0073-02R
AMPure XP (magnetische Beads)	Beckman Coulter, Art.-Nr. A63880
Qubit® dsDNA HS Assay	Fisher Scientific, Art.-Nr. 10616763
Sequenzierungs-Reagenzien	Illumina
TE-Puffer (10 mM Tris-Acetat pH 8.0, 1 mM EDTA)	Variable
Ethanol 100 %	Variable
NaOH 1 N	Variable
Tris Buffer 200 mM pH 7	Variable
Nuclease-free water (nuclease-free Wasser)	Variable

Nach Erhalt und zwischen den einzelnen Verwendungen sollten diese Reagenzien gemäß den Empfehlungen der verschiedenen Lieferanten aufbewahrt werden.

Benötigte Materialien:

Material	Lieferant und Art.-Nr.
Thermocycler im Pre-PCR-Bereich	Variable
Thermocycler im Post-PCR-Bereich	Variable
Qubit® Fluorometer (oder gleichwertig)	Thermo Fisher Scientific, Art.-Nr. Q33238
Qubit® Assay-Röhrchen	Fisher Scientific, Art.-Nr. 12037609
DynaMag™-96 Seitenmagnet – Magnetplatte (AMPure XP Aufreinigung)	Thermo Fisher Scientific, Art.-Nr. 12331D
PCR-Röhrchen und -Platten 200 µL	Variable

Bevor Sie beginnen.

Biologische Proben.

Mit dem **GENEXPATH SarcomaFusion**-Test können Sequenzierbibliotheken aus Gesamt-RNA hergestellt werden, die aus Gewebe- oder Tumorbiopsien von Sarkomen (Knochen- und Weichteiltumoren) extrahiert wurden.

Diese Proben können frisch, gefroren oder formalinfixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE) sein.

Für die Extraktion von RNA aus fixiertem Gewebe wird das Promega Maxwell® RSC RNA FFPE Kit (Promega, Art.-Nr. AS1440 und AS4500) empfohlen.

Die Menge der zu analysierenden RNA sollte zwischen **50 und 500 ng in einem Volumen von 2,5 µL** liegen. Wenn die Konzentration der zu analysierenden Lösungen zu hoch ist, können diese RNAs mit nuclease-freeem Wasser verdünnt werden.

Programmierung von Thermocyclern.

Um das Kontaminationsrisiko zu minimieren, sollten Sie zwei Thermocycler verwenden, einen im Pre-PCR-Bereich und einen im Post-PCR-Bereich.

Es werden zwei Programme benötigt:

- Mit dem ersten werden die ersten drei Schritte des Protokolls durchgeführt: **reverse Transkription der RNA in cDNA, Hybridisierung der Oligo-Nukleotid-Sonden und Ligation**. Es muss in dem Thermocycler, der sich im Pre-PCR-Bereich befindet, durchgeführt werden.
- Mit dem zweiten werden die Ligationsprodukte amplifiziert und die für die Sequenzierung notwendigen Barcodes und Adapter eingebettet. Es muss in dem Thermocycler im Post-PCR-Bereich durchgeführt werden.

Programm 1: Pre-PCR.



Da die Reaktionsvolumina gering sind, stellen Sie sicher, dass die Temperatur des Heizdeckels des Thermocyclers bei allen Programmschritten auf einem hohen Niveau (95 °C) bleibt, um Verdunstung zu vermeiden.

Zwischen den einzelnen Schritten des Programms sind Pausenbereiche bei 4 °C oder 54 °C vorgesehen, damit die notwendigen Reagenzien zugegeben werden können.

Schritt 1: Reverse Transkription von RNA in cDNA.

- Heizdeckel: 95 °C
- 10 Minuten 25 °C
- 60 Minuten bei 42 °C
- 5 Minuten 85 °C
- 4 °C unendlich

Schritt 2: Hybridisierung der Sonden.

- Heizdeckel: 95 °C
- 2 Minuten 95 °C
- 60 °C unendlich (1 h Hybridisierung)

Schritt 3: Ligation.

- Heizdeckel: 95 °C
- 54 °C unendlich (Verteilung des Ligationsmix)
- 15 Minuten 54 °C
- 5 Minuten 98 °C
- 4 °C unendlich

Programm 2: PCR.

- Heizdeckel: 95 °C
- 6 Minuten 94 °C
- 35 x (30 Sekunden 94 °C; 30 Sekunden 58 °C; 30 Sekunden 72 °C)
- 4 Minuten 72 °C
- 4 °C unendlich

Detailliertes Protokoll.

Schritt 1: Reverse Transkription.

Dieser Schritt sollte im Pre-PCR-Bereich durchgeführt werden.

Benötigte Reagenzien.

- 5X Vilo reaction mix, 10X super script (SuperScript Vilo cDNA Synthesis Kit), nuclease-free Wasser, Extrakt der gesamten zu testenden RNA (25 bis 250 ng/μL).



Es wird empfohlen, das gesamte Verfahren in 200-μL-PCR-Röhrchen oder -Platten durchzuführen.

Reverse Transkription.

- Die folgenden Reagenzien auftauen und sie dann auf Eis oder in einem Kühlrack lagern: 5X Vilo reaction mix und 10X super script.
- Einen Mix für die reverse Transkription vorbereiten. Für jede Probe mischen (für ein Gesamtvolumen von 3 μL pro Reaktion):

○ 5X Vilo reaction mix	1 μL
○ Nuclease-free Wasser	1 μL
○ 10X super script	0,5 μL
- Diesen Mix in 200 μL PCR-Röhrchen (2,5 μL pro Röhrchen) verteilen, die auf Eis oder in einem Kühlrack gelagert werden.
- Jeweils 2,5 μL der Gesamt-RNA-Lösungen in die verschiedenen Röhrchen geben.
- Vortexen, kurz zentrifugieren.
- Die Röhrchen in den Thermocycler stellen, der sich im Pre-PCR-Bereich befindet, und **Schritt 1 des Pre-PCR-Programms** durchführen (reverse Transkription von RNA in cDNA).



Anschließend direkt mit Schritt 2 fortfahren oder die Ligationsprodukte bei -30 °C bis -15 °C lagern.

Schritt 2: Hybridisierung der Sonden.

Dieser Schritt sollte im Pre-PCR-Bereich durchgeführt werden.

Benötigte Reagenzien.

- Sonden-Mix **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP- SFPM), SALSA MLPA Buffer

Hybridisierung der Sonden.

- **Nach Abschluss von Schritt 1**, wenn die Temperatur des Thermocyclers wieder auf 4 °C gesunken ist, die Röhrchen herausnehmen, sie kurz zentrifugieren und auf Eis oder in einem Kühlrack lagern.
- Die Puffer Salsa MLP Buffer und den Sonden-Mix **GENEXPATH SarcomaFusion** auftauen und sie auf Eis oder in einem Kühlrack lagern.
- Einen Hybridisierungsmix vorbereiten. Für jede Probe mischen (für ein Gesamtvolumen von 3 µL pro Reaktion):
 - Salsa MLPA Buffer 1,5 µL
 - Sonden-Mix **GENEXPATH SarcomaFusion** 1,5 µL
- Vortexen, kurz zentrifugieren.
- 3 µL dieses Mix in jedes cDNA-Röhrchen geben.
- Kurz zentrifugieren.
- Die Röhrchen wieder in den Thermocycler einsetzen.
- Die Temperatur des Heizdeckels (95 °C) prüfen.
- **Schritt 2 des Pre-PCR-Programms** (Sondenhybridisierung) durchführen.

Schritt 3: Ligation.

Dieser Schritt sollte im Pre-PCR-Bereich durchgeführt werden.

Benötigte Reagenzien.

- SALSA Ligase Buffer A, SALSA Ligase Buffer B, SALSA Ligase 65, nuclease-free Wasser.

Ligation.

- 15 Minuten vor dem Ende von Schritt 2 die Puffer SALSA Ligase Buffer A und SALSA Ligase Buffer B auftauen und sie auf Eis oder in einem Kühlrack lagern.
- Das Enzym SALSA ligase 65 auf Eis oder in ein Kühlrack setzen.

- Einen Ligationsmix vorbereiten. Für jede Probe mischen (für ein Gesamtvolumen von 32 µL pro Reaktion):

○ Nuclease-free Wasser	25 µL
○ Salsa Ligase Buffer A	3 µL
○ Salsa Ligase Buffer B	3 µL
- Vortexen, kurz zentrifugieren

○ Salsa Ligase 65	1 µL
-------------------	------
- Vortexen, kurz zentrifugieren.
- Nach Ablauf der 60-minütigen Inkubationszeit **Schritt 3 des Pre-PCR-Programms (Ligation)** durchführen.
- Die Temperatur des Heizblocks auf 54 °C absenken.
- 32 µL des Ligationsmix direkt in jedes Röhrchen geben, ohne sie aus dem Heizblock zu nehmen.
- Nach dem Verteilen des Mix den nächsten Programmschritt durchführen (15 Minuten bei 54 °C, 5 Minuten bei 98 °C).



Nach diesem Schritt, wenn die Temperatur des PCR-Blocks wieder auf 4 °C gesunken ist, sofort mit Schritt 4 (Amplifikation durch PCR) fortfahren oder die Ligationsprodukte einfrieren (zwischen -30 °C und -15 °C).



Nach diesem Schritt sollten die Produkte nicht bei höheren Temperaturen (z. B. 4 °C oder Raumtemperatur) gelagert werden, um unspezifische Ligationen zu vermeiden, die aus einer Restaktivität des Enzyms resultieren könnten.

Schritt 4: Amplifikation und Integration von Barcodes und Adaptern.

In diesem Schritt werden die Ligationsprodukte durch PCR mithilfe der zusätzlichen Enden an den Enden der Sonden amplifiziert. Diese Amplifikationen werden mithilfe von Primer-Paaren durchgeführt, die in den **GENEXPATH SarcomaFusion**-Barcode-Röhrchen (GEP-BC-xxx) bereitgestellt werden.

Um die Analyse mehrerer Proben auf einer FlowCell zu ermöglichen, trägt der 3'-PCR-Primer einen molekularen Barcode, der vom Demultiplexing-Algorithmus des **GENEXPATH RT-MIS**-Systems erkannt wird.

Um die interne Kontrolle mit den GAPDH-Sonden durchzuführen, werden zwei verschiedene PCRs durchgeführt, daher müssen Sie Ihre Anzahl an Röhrchen verdoppeln. Für eine bestimmte Probe sollte für die Computeranalyse die gleiche Nummer xxx der Barcodes GEP-BC-xxx und GEP-BCC-xxx verwendet werden. Also muss man für jede Probe in einem Röhrchen den Barcode GEP-BC-xxx und im anderen den zugehörigen Barcode GEP-BCC-xxx zugeben.

Benötigte Reagenzien.

- Barcodes **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BC-xxx), Barcodes GAPDH **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BCC-xxx), Red'y' Star PCR Mix, nuclease-free Wasser.

Amplifikation.

- Einen Amplifikationsmix im Pre-PCR-Bereich vorbereiten. Für jede Probe mischen (für ein Gesamtvolumen von 18 µL pro Reaktion):
 - Red'y' Star PCR Mix 12,5 µL
 - Nuclease-free Wasser 5,5 µL
- Vortexen, kurz zentrifugieren.
- 18 µL dieses Amplifikationsmix in verschiedene Wells einer PCR-Platte verteilen.
- 5 µL der in Schritt 3 erzeugten Ligationsprodukte in jeden Well geben.
- 2 µL **GENEXPATH SarcomaFusion**-Barcode (GEP-BC-xxx oder GEP-BCC-xxx, je nach Test) zugeben.



Für jede der getesteten Proben unterschiedliche BEP-BC-xxx-Barcodes verwenden, aber für eine Probe die gleiche Nummer für BEP-BC-xxx und GEP-BCC-xxx verwenden.

- Die Platte in den Thermocycler im Post-PCR-Bereich setzen.
- **Programm 2** (PCR) starten.



Am Ende des Programms, wenn die Temperatur des Thermocyclers wieder auf 4 °C gesunken ist, schnell mit Schritt 5 (Aufreinigung) fortfahren oder die Amplifikationsprodukte zwischen -30 °C und -15 °C einfrieren.



Diese Produkte nicht über einen längeren Zeitraum bei höheren Temperaturen lagern (z. B. 4 °C im Thermocycler oder bei Raumtemperatur).

Schritt 5: Aufreinigung und Dosierung von Sequenzierbibliotheken.

Nach Abschluss des Amplifikationsschrittes müssen die Sequenzierbibliotheken aufgereinigt werden, um PCR-Primer und nicht eingebettete Nukleotide zu entfernen. Diese Aufreinigung wird mithilfe der magnetischen Beads AMPure XP durchgeführt. Die Bibliotheken müssen dann mit dem Qubit® dsDNA HS Kit fluorimetrisch dosiert werden, bevor sie in das Sequenziergerät geladen werden.

Benötigte Reagenzien.

- Ethanol 100 %, nuclease-free Wasser, magnetische Beads AMPure XP, TE-Puffer (10 mM Tris-Acetat pH 8.0, 1 mM EDTA), Qubit® dsDNA HS Assay.

Schritt 5.a: Aufreinigung der Sequenzierbibliotheken.



Sicherstellen, dass die Beads vor der Verwendung vollständig resuspendiert sind.

- 25 µL PCR-Produkte mit 45 µL AMPure XP Beads aufreinigen (gemäß den Empfehlungen des Herstellers).
- Die aufgereinigten PCR-Produkte in 50 µL TE-Puffer eluieren.



Nach der Aufreinigung können die Bibliotheken vor der Sequenzierung bei -30 °C bis -15 °C gelagert werden.

Schritt 5.b: Dosierung von Sequenzierbibliotheken.

- 10 µL jeder Sequenzierbibliothek fluorimetrisch mithilfe des Qubit® dsDNA HS Assays dosieren.

Schritt 6: Verdünnung, Poolen und Sequenzierung der Bibliotheken.

Nach der Reinigung müssen die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken verdünnt, gebündelt und in den Sequenzer geladen werden.



Um optimale Ergebnisse zu erzielen, müssen für jede Probe mindestens 10⁵ Sequenzen gelesen werden.

Anders als bei den meisten herkömmlichen Sequenzierbibliotheken erfolgt das Lesen der molekularen Barcodes, die zum Demultiplexen der **GENEXPATH SarcomaFusion** Sequenzen benötigt werden, während des Read1. Diese Sequenzen werden also nicht automatisch vom Sequenzer demultiplext und werden in den fastQ „Undetermined“-Dateien gespeichert. Das Demultiplexen erfolgt mithilfe eines speziellen Algorithmus, der im **GENEXPATH RT-MIS**-System zur Verfügung gestellt wird.

Benötigte Reagenzien.

- Sequenzierungsprimer **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001), Kontrollsequenzierungsprimer **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-002) (wenn interne Kontrolle durchgeführt wird), Illumina Sequenzierungs-Reagenzien.

Sequenzierung in einem Illumina MiSeq-Sequenziergerät.

Ausführliche Informationen zur Verdünnung und Denaturierung der Bibliotheken, zur Vorbereitung des Sequenzierungsprimers, zum Probenblatt und zum Start der Sequenzierung finden Sie im Illumina-Leitfaden für das Miseq-System.

- **Schritt 6.a: Verdünnung und Poolen von Bibliotheken.**

- Jede **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothek auf eine Konzentration zwischen 2 nM und 4 nM verdünnen, und dabei von einer durchschnittlichen Größe der amplifizierten Fragmente von 150 bp ausgehen.
- Die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken im gleichwertigen Volumen poolen.
- Wenn weitere Bibliotheken auf derselben Flowcell sequenziert werden, die Konzentrationen der verschiedenen Pools anpassen und sie dann kombinieren, um die gewünschte Anzahl an Sequenzen zu erhalten (mindestens 10^5 Sequenzen für jede **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothek).

Beispiel: Für einen Pool von 10 **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken, die 1 M Sequenzen benötigen (10^5 Sequenzen für jede Bibliothek), die mit einem Pool von B-Bibliotheken mit derselben Konzentration sequenziert wurden und 3 M Sequenzen benötigen, 1 μ L des **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothekspools und 3 μ L des B-Bibliothekspools mischen.

- **Schritt 6.b: Denaturierung und Verdünnung des Bibliothekspools.**

- Den Endpool gemäß den Empfehlungen der Anleitung des Illumina Miseq-Systems denaturieren und verdünnen, um eine endgültige Ladungskonzentration zwischen 8 und 10 pM zu erhalten.

- **Schritt 6.c: Vorbereitung der Sequenzierungsprimer.**

- Wenn der **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothekspool allein sequenziert wird, 3 μ L jedes **GENEXPATH SarcomaFusion**-Sequenzierungsprimers (GEP-SP-001 und GEP-SP-002, falls interne Kontrolle) in einem Endvolumen von 600 μ L HT1-Puffer verdünnen und diese 600 μ L in Well 18 der MiSeq-Reagenzkassette geben.
- Wenn der **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothekspool mit anderen Bibliotheken beladen ist, die mit Illumina Sequenzierungsprimern sequenziert wurden, den gesamten Inhalt von Well 12 (ca. 600 μ L) pipettieren, 3 μ L jedes **GENEXPATH SarcomaFusion**-Sequenzierungsprimers (GEP-SP-001 und GEP-SP-002, falls interne Kontrolle) zugeben und diesen Mix dann wieder in Well 18 der Kassette geben.

- **Schritt 6.d: Vorbereitung des Probenblatts.**

- Wenn die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothek allein sequenziert wird, das Probenblatt zur Erzeugung der FASTQs erstellen, wobei 120 Zyklen in Read 1 vorzusehen sind.
- Wenn die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken mit anderen Sequenzierbibliotheken kombiniert werden, das Probenblatt mit den üblichen Parametern erstellen, ohne die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Proben anzugeben.

- Die Verwendung von Custom bei der Konfiguration des Laufs angeben (mit Local Run Manager auf der Seite Create Run. Im manuellen Laufmodus auf dem Bildschirm Run Setup).



Achten Sie in jedem Fall darauf, dass das Lesen in Read 1 mit mindestens 120 Zyklen erfolgt und dass das Kontrollkästchen für Custom Primer for Read 1 aktiviert wird.

- In allen Fällen werden die Sequenzen der **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken nicht vom Sequenzer demultiplext, sondern in der FastQ-Datei „Undetermined“ gespeichert, die dann in das **GENEXPATH RT-MIS**-System geladen werden muss.
- **Schritt 6.e: Starten der Sequenzierung.**
- Die Sequenzierung gemäß den in der Anleitung des Illumina MiSeq-Systems beschriebenen Verfahren starten.

Sequenzierung in einem Illumina NextSeq 500/550 System.

Detaillierte Informationen zur Verdünnung und Denaturierung der Bibliotheken, zur Vorbereitung des Sequenzierungsprimers, zum Probenblatt und zum Start der Sequenzierung finden Sie in der Anleitung für das Illumina NextSeq-System.

- **Schritt 6.a: Verdünnung und Poolen von Bibliotheken.**
- Jede **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothek auf eine Konzentration zwischen 0,5 nM und 4 nM verdünnen, und dabei von einer durchschnittlichen Größe der amplifizierten Fragmente von 150 bp ausgehen.
- Die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken im gleichwertigen Volumen poolen.
- Wenn weitere Bibliotheken auf derselben Flowcell sequenziert werden, die Konzentrationen der verschiedenen Pools anpassen und sie dann kombinieren, um die gewünschte Anzahl an Sequenzen zu erhalten (mindestens 10^5 Sequenzen für jede **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothek).

Beispiel: Für einen Pool von 10 **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken, die 1 M Sequenzen benötigen (10^5 Sequenzen für jede Bibliothek), die mit einem Pool von B-Bibliotheken mit derselben Konzentration sequenziert wurden und 3 M Sequenzen benötigen, 1 µL des **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothekspools und 3 µL des B-Bibliothekspools mischen.

- **Schritt 6.b: Denaturierung und Verdünnung des Bibliothekspools.**
- Den Endpool gemäß den Empfehlungen der Anleitung des Illumina NextSeq-Systems denaturieren und verdünnen, um eine endgültige Beladungskonzentration von 0,8 pM bis 1 pM zu erhalten.

- **Schritt 6.c: Vorbereitung der Sequenzierungsprimer.**

- Wenn der **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothekspool allein sequenziert wird, 6 µL jedes **GENEXPATH SarcomaFusion**-Sequenzierungsprimers (GEP-SP-001 und GEP-SP002, falls interne Kontrolle) in einem Endvolumen von 2000 µL HT1-Puffer verdünnen und diese 2 mL in Well 7 der NextSeq-Reagenzkassette geben.
- Wenn der **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothekspool mit anderen Bibliotheken kombiniert ist, die mit Illumina Sequenzierungsprimern sequenziert wurden, den gesamten Inhalt von Well 20 (ca. 2 mL) pipettieren, 6 µL jedes **GENEXPATH SarcomaFusion**-Sequenzierungsprimers (GEP-SP-001 und GEP-SP-002, falls interne Kontrolle) zugeben und diesen Mix dann wieder in Well 7 der Kassette geben.

- **Schritt 6.d: Vorbereitung des Probenblatts.**

- Wenn die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothek allein sequenziert wird, das Probenblatt zur Erzeugung der FASTQs erstellen, wobei 120 Zyklen in Read 1 vorzusehen sind.
- Wenn die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken mit anderen Sequenzierbibliotheken kombiniert werden, das Probenblatt mit den üblichen Parametern erstellen, ohne die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Proben anzugeben.
- Die Verwendung von Custom bei der Konfiguration des Laufs angeben (mit Local Run Manager auf der Seite Create Run. Im manuellen Laufmodus auf dem Bildschirm Run Setup).



Achten Sie in jedem Fall darauf, dass das Lesen in Read 1 mit mindestens 120 Zyklen erfolgt und dass das Kontrollkästchen für Custom Primer for Read 1 aktiviert wird.

- In allen Fällen werden die Sequenzen der **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken nicht vom Sequenzer demultiplext, sondern in den vier FastQ-Datei „Undetermined“ gespeichert, die dann in das **GENEXPATH RT-MIS**-System geladen werden müssen.

- **Schritt 6.e: Starten der Sequenzierung.**

- Die Sequenzierung gemäß den in der Anleitung des Illumina NextSeq-Systems beschriebenen Verfahren starten.

Schritt 7: Analyse der Ergebnisse.

Die vom Illumina-Sequenzierungssystem (MiSeq oder NextSeq) erzeugten Sequenzdateien im FastQ-Format müssen anschließend mit der Software **GENEXPATH RT-MIS** analysiert werden, die online unter folgender Adresse zur Verfügung steht: <https://connect.genexpath.com/>.



Um das Herunterladen der FastQ-Datei zu erleichtern, darf sie nicht dekomprimiert werden (fastq.gz).



Diese Software ist eine umfassende Bioinformatik-Lösung, die verschiedene Algorithmen zur Datenverarbeitung integriert. Sie führt das Demultiplexen durch, das die Zuordnung der Sequenzen zu den einzelnen Proben ermöglicht. Anschließend führt sie eine genaue Identifizierung der Genexpressionsmarker und deren Quantifizierung durch.

Der **GENEXPATH SarcomaFusion**-Test basiert auf einer Quantifizierung qualitativer Marker, die das Vorhandensein oder Fehlen von Chromosomentranslokationen charakterisieren.

GENEXPATH RT-MIS erstellt kurze, transparente Berichte, die vom Einrichten der Sequenzierungsreaktionen bis zur automatisierten Analyse der Sequenzierungsergebnisse reichen.

GENEXPATH RT-MIS erfordert das Hochladen der Sequenzerdateien im FASTQ-Format sowie der Liste der Barcodes, die während des Experiments verwendet wurden.

GENEXPATH RT-MIS bewertet die Qualität der Sequenzierung jeder Probe, indem es die Anzahl der identifizierten Reads und die Anzahl der gefundenen UMIs (unique molecular identifier) quantifiziert.

GENEXPATH RT-MIS erstellt für jede Probe einen Analysebericht, der angibt, ob ein Fusionstranskript vorhanden ist, wie viele Reads und MMUs erzielt wurden und eine Literaturreferenz, die dem Transkript entspricht (falls eine Fusion festgestellt wurde). Diese Daten stehen zum Download zur Verfügung.

GENEXPATH RT-MIS beinhaltet ein direkt online zugängliches Anwenderhandbuch, um den Einstieg in das Tool zu erleichtern, alle erzeugten Ergebnisse zu beschreiben und die Präsentation der Ergebnisse detailliert darzustellen.

Das Unternehmen **GENEXPATH** speichert die von der Software **GENEXPATH RT-MIS** erzeugten Ergebnisse nicht dauerhaft. Die Daten sollten direkt nach jeder Analyse heruntergeladen und vom Anwender in seinem Dokumentenmanagementsystem gespeichert werden.

Verfahrensgrenzen

- Der SarcomaFusion-Test ist optimiert, um mögliche Fusionstranskripte gemäß den im Mix vorhandenen Sonden bei Patienten mit Sarkomen nachzuweisen. Die getesteten Probentypen sind FFPE- oder gefrorene Proben, die möglicherweise aus Nadelbiopsien gewonnen wurden.
- Die im Abschnitt „Leistungsbestimmung“ nachgewiesenen Leistungen wurden nach dem oben genannten Verfahren validiert.
- Eine geringe Menge an RNA oder eine Probe von geringer Qualität kann zu einem nicht interpretierbaren Ergebnis führen.
- Die Sequenzierung sollte mit Sequenziergeräten der Illumina-Technologie (Miseq und NextSeq) durchgeführt werden.

Leistungsbestimmung

Analytische Leistungen

Um die analytische Leistung des SarcomaFusion GENEXPATH-Tests nachzuweisen, wurden 4 RNAs aus FFPE-Proben (3 positiv und 1 negativ) und 3 RNAs aus gefrorenen Proben (alle positiv) von Sarkom-Patienten sowie 2 Zellreihen (negative Proben) ausgewertet. Die erwarteten Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Nach der Analyse mit der Analysesoftware RT-MIS wurden die Ergebnisse gemäß dem in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren ermittelt und in Tabelle 2 zusammengefasst.

Diesen Ergebnissen zufolge bietet der SarcomaFusion-Test eine hohe Sensitivität und Spezifität für den Nachweis von Fusionstranskripten, die mit Sarkomen in Verbindung stehen.

Tabelle 1: Zusammenfassung der erwarteten Ergebnisse

Probe	expected result / <i>obtained</i>	Vorhersagewert	
Probe 1	EWSR1 exon 7 - CREB1 exon 7 <i>EWSR1 exon 7 - CREB1 exon 7</i>	Richtig positiv (VP)	6
Probe 2	JAZF1 exon 3 - SUZ12 exon 2 <i>JAZF1 exon 3 - SUZ12 exon 2</i>	Richtig negativ (WN)	3
Probe 3	PAX3_7 exon 7 - FOXO exon 2 <i>PAX3_7 exon 7 - FOXO exon 2</i>	Positiver Vorhersagewert (%)	100%
Probe 4	Negative <i>no fusion detected</i>	Treffer (%)	100%
Probe 5	SS18 exon 10 – SSX exon6 <i>SS18 exon 10 – SSX exon6</i>	Falsch-positive Rate (%)	0%
Probe 6	PAX3_7 exon 7 – FOXO exon 2 <i>PAX3_7 exon 7 – FOXO exon 2</i>	Sensitivität (%)	100%
Probe 7	EWSR1 exon 7 – FLI1 exon 6 <i>EWSR1 exon 7 – FLI1 exon 6</i>	Falsch-positiv (FP)	0
Zellreihe 1	Negative <i>No fusion detected</i>	Falsch-negativ (FN)	0
Zellreihe 2	Negative <i>no fusion detected</i>	Negativer Vorhersagewert (%)	100%
		Präzision (%)	100%
		Falsch-negative Rate (%)	0%
		Spezifität (%)	100%

Die Ergebnisse zeigen, dass der SarcomaFusion-Test eine hohe Sensitivität und Spezifität für die Detektionsfusionstranskripte in Sarkomen bietet.

Analytische Leistungen an einer Patientenkohorte

Eine 2022 veröffentlichte Studie an 158 Knochen- und Weichteiltumorproben (Lanic MD et al., Modern Pathology, 2022) zeigte folgende Leistung:

Empfindlichkeit = 98,1%

Spezifität = 100%

In diesem Artikel berichten die Autoren, dass die wenigen Anomalien, die durch den SarcomaFusion-Test nicht erkannt wurden, erklärt werden durch:

- Das Vorhandensein seltener oder komplexer Translokationen, die nicht vom SarcomaFusion-Test abgedeckt werden
- Die geringe Qualität und Quantität der RNA einiger Proben

Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit des SarcomaFusion-Assays ist definiert als seine Fähigkeit, ein erwartetes Fusionstranskript genau zu quantifizieren. Es wurden zwei Tests durchgeführt:

- Ein Test zum Testen der Wiederholbarkeit der Ergebnisse von 3 Proben innerhalb desselben Durchlaufs - Ein zweiter Test, der es ermöglicht, die Wiederholbarkeit der Ergebnisse von 5 Proben in 3 verschiedenen Durchläufen zu testen

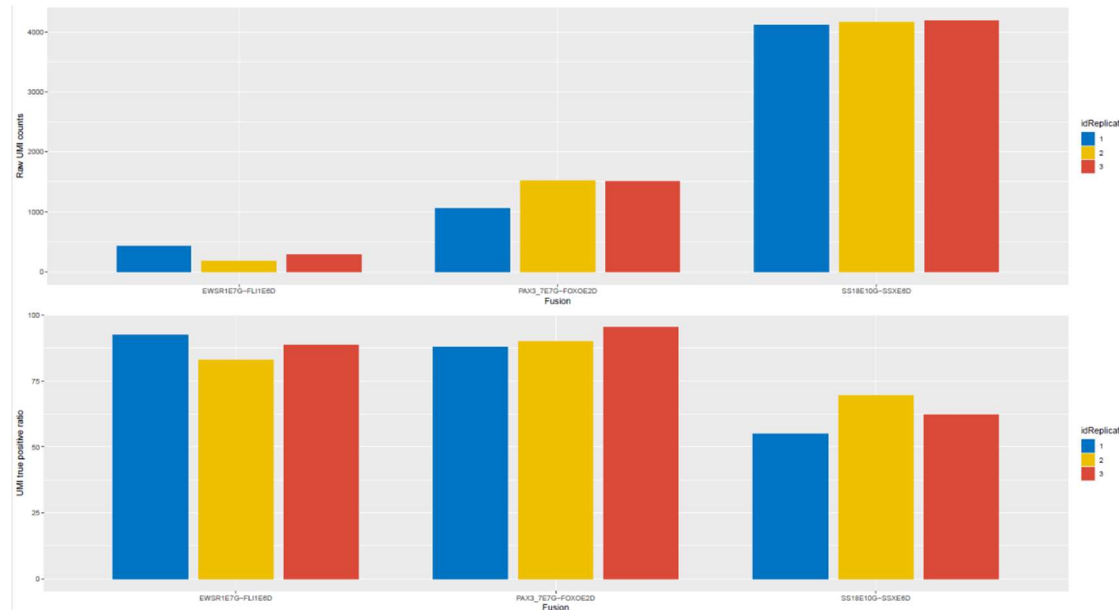


Abbildung 1: Die Histogramme stellen oben die rohe Anzahl der erkannten UMIs und unten die rohe Anzahl der UMIs dar, die sich auf die Gesamtzahl der UMIs der Stichprobe gemäß der erwarteten Fusion und den Replikaten beziehen.

Wiederholbarkeits-Zwischenläufe

5 Proben, die mit dem SarcomaFusion-Test analysiert wurden, wurden in 3 verschiedenen Durchläufen untersucht (Abbildung 2). Die Zählraten für jede Fusion sind perfekt vergleichbar.

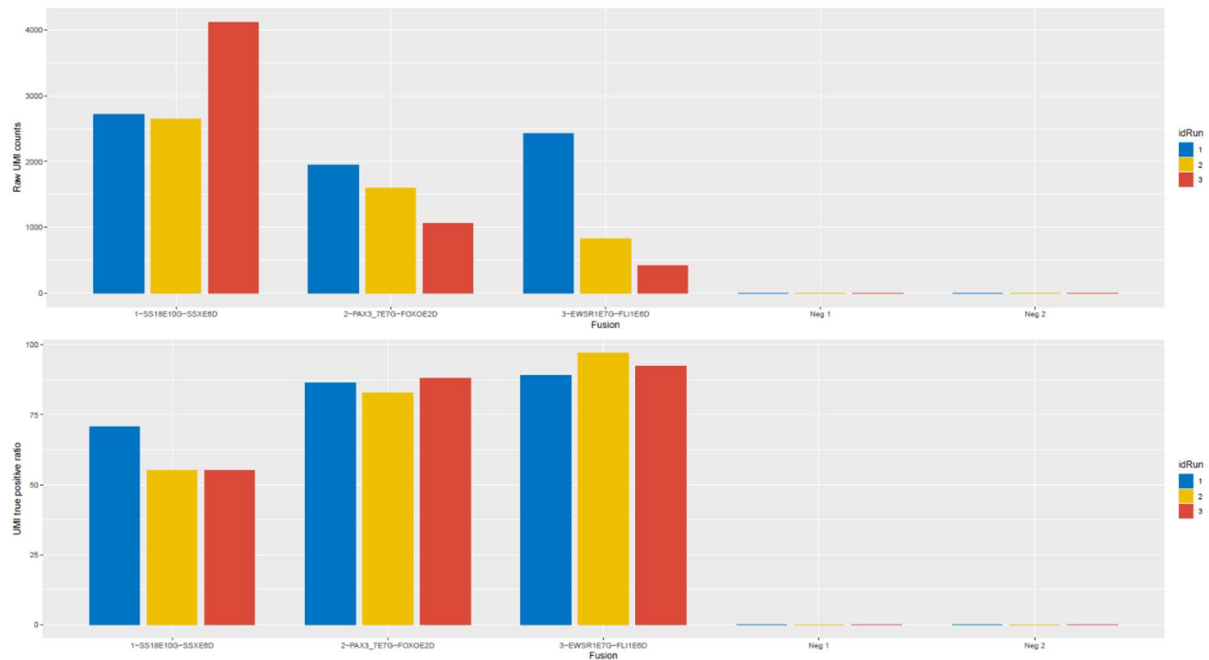


Abbildung 2: Die Histogramme stellen oben die Rohzahl der detektierten UMI und unten die Rohzahl der UMI bezogen auf die Gesamtzahl der UMI der Stichprobe entsprechend der erwarteten Fusion und des Laufs dar.

Reproduzierbarkeit

Reproduzierbarkeit bezieht sich auf die Fähigkeit des SarcomaFusion-Tests, Translokationen zwischen verschiedenen Benutzern unter identischen Bedingungen zu erkennen.

Um diesen Parameter zu bewerten, wurden 5 Proben von 3 verschiedenen Anwendern analysiert:

- 3 positive Proben (SS18 Exon 10 – SSX Exon 6, PAX3_7 Exon 7 – FOXO Exon 2, EWSR1 Exon 7 – FLI1 Exon 6)
- 2 negative Proben (Zelllinien)

Die in Abbildung 3 dargestellten Daten zeigen eine reproduzierbare Quantifizierung zwischen verschiedenen Benutzern.

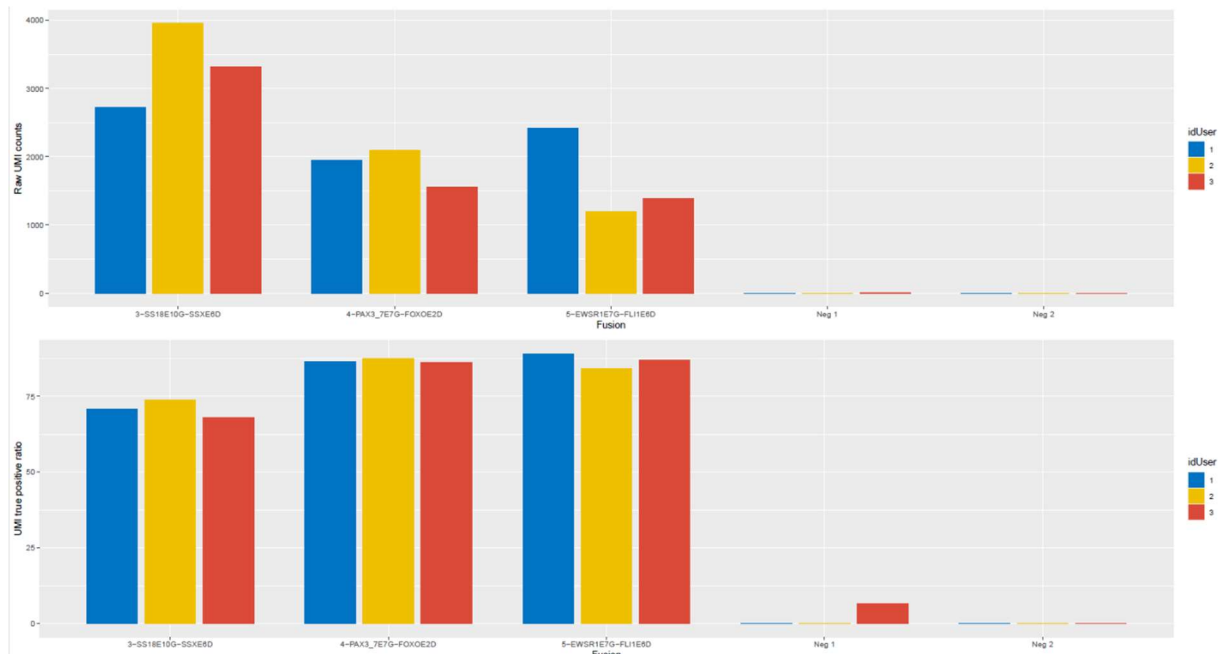


Abbildung 3: Die Histogramme stellen oben die Rohzahl der erkannten UMI und unten die Rohzahl der UMI bezogen auf die Gesamtzahl der UMI der Stichprobe entsprechend der erwarteten Fusion und des Benutzers dar.

Analytische Sensibilität

Die analytische Sensitivität des SarcomaFusion-Tests ist definiert als seine Fähigkeit, Translokationen als Funktion der RNA-Menge in der Probe und des Prozentsatzes der Tumorzellen in der Probe zu erkennen.

Um diese beiden Empfindlichkeitsgrenzen zu bestimmen, wurden zwei serielle Verdünnungen aus 2 Proben durchgeführt:

- Eine Verdünnung in Wasser, um einen Abfall der RNA-Menge zu simulieren
- Eine Verdünnung der zu testenden Probe in universeller RNA, um eine Abnahme der Tumoranreicherung zu simulieren

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

Die Verdünnung von zwei Kontrollproben auf Anfangsmengen von 529 und 489 ng RNA in nuclease-freem Wasser zeigt, dass die erwarteten Fusionen noch bei 4 ng RNA-Mengen nachgewiesen werden. Auch wenn die Quantifizierung der Fusionen von der Tumoranreicherung der getesteten Probe abhängt, liegt der erhaltene Grenzwert deutlich unter den Empfehlungen für die Verwendung des SarcomaFusion-Tests (zwischen 50 und 500 ng).

Der zweite Bereich von Verdünnungen aus zwei positiven Proben und universeller RNA zeigt, dass die erwarteten Anomalien immer bei 3% der Tumorprobe nachgewiesen werden. Bei 0% positiver RNA weist der Test keine Spuren der Fusionen mehr nach.

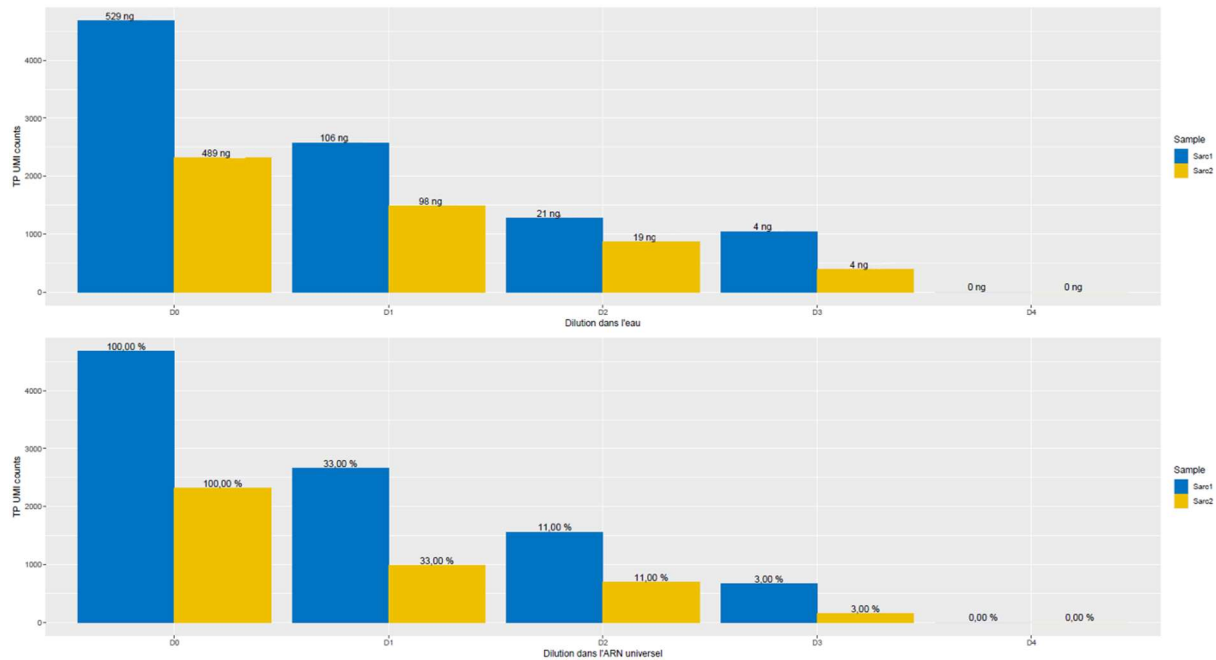


Abbildung 4: Die Histogramme stellen die rohe Anzahl der UMIs dar, die aus den erwarteten Fusionen in zwei Proben gemäß den Verdünnungsbereichen in Wasser (oben) oder in universeller RNA (unten) nachgewiesen wurden.

Literatur

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).

Symboltabelle

 Hersteller	 Bezeichnung des Reagenz
 Herstellungsdatum	 Zulässiger Temperaturbereich
 Verwendbar bis	 Gebrauchsanweisung lesen
 Chargennummer	 CE-Kennzeichnung – europäische Konformität
	 <i>In-vitro</i> -Diagnostikum

Hinweise

Die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Reagenzien sind durch geistige Eigentumsrechte geschützt und dürfen ohne Genehmigung des Herstellers nicht verändert, vervielfältigt, verkauft oder übertragen werden.

Änderungen am Inhalt dieses Dokuments sind vorbehalten.



ESPAÑOL

Instrucciones de utilización GENEXPATH SarcomaFusion.

Precauciones de uso.



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro* según con la Directiva (UE) 98/79/CE

Para diagnóstico *in vitro*.

Exclusivamente para uso profesional.

Lea toda la información contenida en estas instrucciones antes de su uso.

Información de contacto:

Fabricante: GENEXPATH

+33 (0)2.78.08.98.69

113 avenue des Martyrs de la Résistance

76100 Rouen - Francia

contact@genexpath.com

support@genexpath.com

ESPAÑOL.....	74
Precauciones importantes.....	77
Recomendaciones generales.	77
Pictogramas	77
Uso previsto.....	78
Principio de la prueba.	78
Reactivos.....	79
Contenido del kit de reactivos GENEXPATH SarcomaFusion.....	79
Formato de los kits de reactivos comercializados y cantidades:.....	80
Reactivos no suministrados en el kit de reactivos:.....	80
Material necesario:	81
Antes de empezar.....	81
Muestras biológicas.	81
Programación de los termocicladores.	82
Programa 1:post-PCR.	82
Programa 2: PCR.....	83
Protocolo detallado.	83
Etapa 1: Transcripción inversa.	83
Reactivos necesarios.	83
Transcripción inversa.	83
Etapa 2: Hibridación de las sondas.	84
Reactivos necesarios.	84
Hibridación de las sondas.....	84
Etapa 3: Ligación.	85
Reactivos necesarios.	85
Ligación.....	85
Etapa 4: Amplificación e incorporación de códigos de barras y adaptadores.	86
Reactivos necesarios.	86
Amplificación.....	86
Etapa 5: Purificación y análisis de las bibliotecas de secuenciación.....	87
Reactivos necesarios.	87

Etapa 5.a: Purificación de las bibliotecas de secuenciación.	87
Etapa 5.b: Análisis de las bibliotecas de secuenciación.	87
Etapa 6: Dilución, pool y secuenciación de las bibliotecas.	87
Reactivos necesarios.	88
Secuenciación en un secuenciador Illumina MiSeq.	88
Secuenciación en una plataforma Illumina NextSeq 500/550.	89
Etapa 7: Análisis de los resultados.	91
Limitaciones del procedimiento	91
Caracterización de las prestaciones	92
Prestaciones analíticas.	92
Tabla 1: Resumen de los resultados previstos	92
Rendimiento analítico en una cohorte de pacientes.	93
Repetibilidad	93
Repetibilidad intra-run.	93
Repetibilidad intra-run.	94
Bibliografía	96
Tabla de símbolos	97
Notas.	97

Precauciones importantes.

Recomendaciones generales.

- Se puede utilizar para diagnóstico *in vitro*
- Respete las buenas prácticas de laboratorio al manipular los productos destinados a la PCR (llevar bata y guantes desechables, establecer zonas específicas previas y posteriores a la PCR, utilizar filtros cónicos).
- Tome asimismo precauciones para evitar la contaminación con nucleasas, que pueden causar la degradación del ARN y el ADN (utilizar consumibles y reactivos libres de nucleasas).
- Asegúrese de que los termocicladores estén en buen estado de funcionamiento y que se hayan calibrado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
- Es especialmente importante no sustituir los reactivos no suministrados en el kit, especialmente los tampones y las enzimas utilizadas en los pasos de transcripción inversa, ligación y amplificación por PCR. También deben respetarse los tiempos y las temperaturas de incubación, así como los volúmenes y las concentraciones.
- El kit de prueba **SarcomaFusion** contiene un control positivo interno de GAPDH. Se recomienda encarecidamente que lo haga para validar que su experimento se ha realizado correctamente.
- Los reactivos **GENEXPATH SarcomaFusion** están destinados a su uso exclusivamente en las plataformas de secuenciación Illumina Miseq o Nextseq 500/550.
- Las fichas de datos de seguridad están disponibles en el espacio de usuarios.
- Si el usuario detecta errores en las instrucciones proporcionadas: envíe un correo electrónico a contact@genexpath.com.
- Cualquier incidente grave en relación con el dispositivo debe ser notificado a nosotros en la dirección / Cualquier incidente grave relacionado con el producto debe notificarse a contact@genexpath.com.

Pictogramas



Puntos importantes y etapas vitales del protocolo que pueden comprometer la calidad de los resultados.



Etapas en las que se puede suspender el protocolo.

Uso previsto

Este protocolo está destinado a la realización de la prueba **GENEXPATH SarcomaFusion**. Se utiliza para preparar bibliotecas de secuenciación para los secuenciadores Illumina MiSeq o NextSeq 500/550.

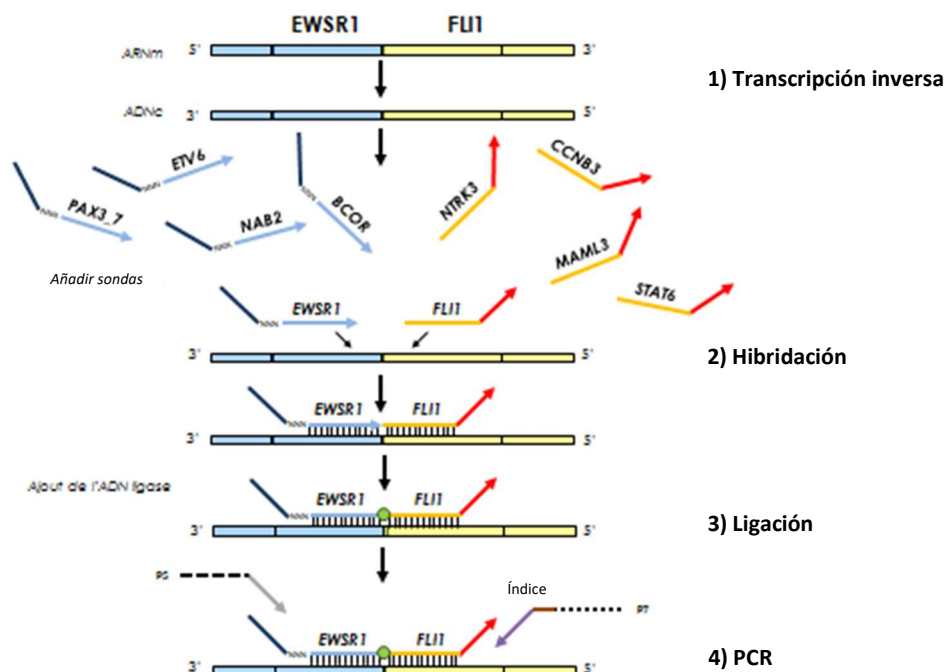
Los archivos fastQ generados mediante esta prueba contienen datos de recuento de secuencias correspondientes a la posible presencia de un transcrito de fusión; es decir, la ligación de dos sondas y su amplificación.

Pueden analizarse mediante el *software* **GENEXPATH RT-MIS**, que alberga una aplicación específica de demultiplexación de secuencias.

Esta prueba permite detectar los transcritos de fusión que se encuentran en 58 tipos de tumores de huesos y tejidos blandos mediante el estudio de 138 genes.

Principio de la prueba.

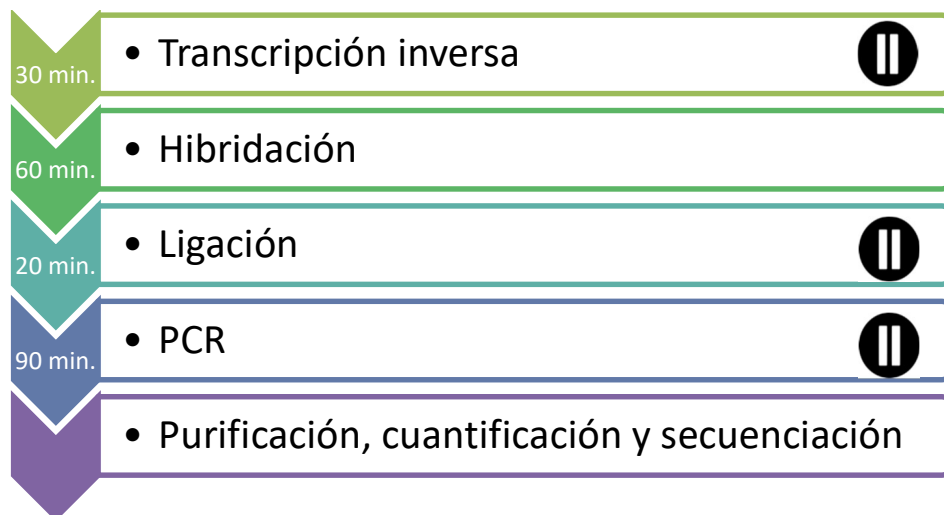
La prueba **GENEXPATH SarcomaFusion** se basa en un método de RT-PCR dependiente de la ligación (LD-RT-PCR). Esta técnica semicuantitativa permite detectar translocaciones cromosómicas utilizando pares de sondas de oligonucleótidos específicos. Se incluye un par de sondas para un gen de control (GAPDH) en la mezcla de sondas de la prueba para proporcionar un control interno para la prueba.



A partir de un extracto de ARN total, bastan cuatro etapas para obtener las bibliotecas.

- Una etapa de transcripción inversa (RT, por sus siglas en inglés).

- Una etapa de hibridación de sondas oligonucleótidas específicas.
- Una etapa de ligación.
- Una etapa de amplificación mediante PCR.



No se requiere ninguna purificación hasta la obtención de las bibliotecas, lo que limita la pérdida de material y garantiza una muy buena sensibilidad de esta técnica. Asimismo, las secuencias genéticas a las que se dirigen las sondas son especialmente cortas (entre 40 y 60 bases), lo que garantiza una gran solidez frente a la degradación del ARN.

Por tanto, la LD-RT-PCR es un enfoque particularmente adecuado para el análisis de muestras biológicas difíciles, como las biopsias de tejido fijadas e incluidas en parafina.

Para cada muestra, aproximadamente 10^5 secuencias son suficientes para obtener un perfil de expresión analizable, lo que permite analizar un gran número de muestras en paralelo en una única celda de flujo de secuenciación. Las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** también pueden cargarse junto con otras bibliotecas de secuenciación generadas por otros métodos.

Reactivos.

Contenido del kit de reactivos GENEXPATH SarcomaFusion

Mezcla de sondas GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-SFPM
Códigos de barras GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-BC-xxx
Cebador de secuencia GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-SP-001
Códigos de barras GAPDH GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-BCC-xxx
Cebador de secuencia GAPDH GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-SP-002

XXX: número de código de barras

Una vez recibidos, estos reactivos deben conservarse a una temperatura entre -30°C y -15°C .

Estos están listos para su uso y no es necesario diluirlos.

La vida útil de los reactivos es de 1 año.

Vuelva a las condiciones de almacenamiento inmediatamente después de su uso.

No utilice reactivos después de la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta.

Formato de los kits de reactivos comercializados y cantidades:

	Kit de reactivos - U = número de análisis			
	8U	16U	24U	48U
Mezcla de sondas GEP-SFPM	30 μL	48 μL	54 μL	108 μL
Códigos de barras GEP-BC-xxx (de 001 a 032 según el número de análisis adquiridos) BC=código de barras	8 BC	8 BC	12 BC	24 BC
	N.º 017 a 024	N.º 001 a 008	N.º 021 a 032	N.º 001 a 024
	5 $\mu\text{L}/\text{BC}$	8 $\mu\text{L}/\text{BC}$	6 $\mu\text{L}/\text{BC}$	6 $\mu\text{L}/\text{BC}$
Cebadores de secuencia GEP-SP-001	96 μL	144 μL	180 μL	360 μL
Para el control interno				
Códigos de barras GAPDH GEP-BCC-xxx (de 001 a 032 según el número de análisis adquiridos) BCC=código de barras de control	8 BCC	8 BCC	12 BCC	24 BCC
	N.º 017 a 024	N.º 001 a 008	N.º 021 a 032	N.º 001 a 024
	5 $\mu\text{L}/\text{BCC}$	8 $\mu\text{L}/\text{BCC}$	6 $\mu\text{L}/\text{BCC}$	6 $\mu\text{L}/\text{BCC}$
Cebadores de secuencia GAPDH GEP-SP-002	96 μL	144 μL	180 μL	360 μL

Los reactivos se suministran en cantidades mayores de las que se necesitan realmente. Después del número de análisis solicitados, deben descartarse. Si se realiza un nuevo pedido, los reactivos se entregarán en consecuencia.

Para un kit de reactivos con más de 8 análisis, cada código de barras debe utilizarse para 2 análisis diferentes.

Reactivos no suministrados en el kit de reactivos:

Reactivos	Proveedores y referencias
SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, ref. 11754250
SALSA MLPA Buffer	MRC Holland, ref. SMR33
SALSA Ligase Buffer A	MRC Holland, ref. SMR12
SALSA Ligase Buffer B	MRC Holland, ref. SMR13
SALSA Ligase 65	MRC Holland, ref. SMR20
Red'y' Star PCR Mix	Eurogentec, ref. PK-0073-02R

AMPure XP (marmoles magnéticas)	Beckman Coulter, ref. A63880
Qubit® dsDNA HS Assay	Fisher Scientific, ref. 10616763
Reactivos de secuenciación	Illumina
Tampón TE (10 mM Tris-Acetate pH 8.0, 1 mM EDTA)	Variable
Etanol 100 %	Variable
NaOH 1 N	Variable
Tris Buffer 200 mM pH 7	Variable
Nuclease free agua	Variable

Una vez recibidos y entre usos, estos reactivos deben almacenarse según las recomendaciones de los distintos proveedores.

Material necesario:

Material	Proveedores y referencias
Termociclador en la zona pre-PCR	Variable
Termociclador en la zona post-PCR	Variable
Qubit® Fluorometer (o equivalente)	Thermo Fisher Scientific, ref. Q33238
Qubit® Assay Tubes	Fisher Scientific, ref. 12037609
DynaMag™-96 Side Magnet - Placa magnética (purificación AMPure XP)	Thermo Fisher Scientific, ref. 12331D
Tubos y placas de PCR de 200 µL	Variable

Antes de empezar.

Muestras biológicas.

La prueba **GENEXPATH SarcomaFusion** se utiliza para preparar bibliotecas de secuenciación a partir de ARN total extraído de tejidos o biopsias tumorales de sarcomas (tumores de huesos y tejidos blandos).

Estas muestras pueden ser frescas, congeladas o fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE).

Para la extracción de ARN de tejidos fijados, se recomienda utilizar el kit Promega Maxwell® RSC RNA FFPE (Promega, ref. AS1440 y AS4500).

La cantidad de ARN para analizar debe estar entre **50 y 500 ng, en un volumen de 2,5 µL**. Si la concentración de las soluciones para analizar es demasiado alta, estos ARN pueden diluirse con agua Nuclease free.

Programación de los termocicladores.

Para limitar el riesgo de contaminación, utilice dos termocicladores, uno en la zona pre-PCR y otro en la zona post-PCR.

Se necesitan dos programas:

- El primero permite realizar las tres primeras etapas del protocolo: **transcripción inversa del ARN en ADNc, hibridación de las sondas de oligonucleótidos y ligación**. Debe realizarse en el termociclador situado en la zona pre-PCR.
- El segundo se utiliza para amplificar los productos de ligación e incorporar los códigos de barras y adaptadores necesarios para la secuenciación. Debe realizarse en el termociclador situado en la zona post-PCR.

Programa 1:post-PCR.



Dado que los volúmenes de reacción son limitados, asegúrese de que la tapa calefactora del termociclador se mantenga a una temperatura elevada (95 °C) en todas las etapas del programa para evitar la evaporación.

Se prevén pausas a 4 °C o 54 °C entre las diferentes etapas del programa para permitir la adición de los reactivos necesarios.

Etapas 1: Transcripción inversa del ARN en ADNc.

- Tapa calefactora: 95 °C
- 10 minutos a 25 °C
- 60 minutos a 42 °C
- 5 minutos a 85 °C
- 4°C infinito

Etapas 2: Hibridación de las sondas.

- Tapa calefactora: 95 °C
- 2 minutos a 95 °C
- 60 °C infinito (1 h de hibridación)

Etapas 3: Ligación.

- Tapa calefactora: 95 °C
- 54 °C infinito (distribución de la mezcla de ligación)
- 15 minutos a 54 °C
- 5 minutos a 98 °C
- 4°C infinito

Programa 2: PCR.

- Tapa calefactora: 95 °C
- 6 minutos a 94 °C
- 35 x (30 segundos a 94 °C; 30 segundos a 58 °C; 30 segundos a 72 °C)
- 4 minutos a 72 °C
- 4°C infinito

Protocolo detallado.

Etapa 1: Transcripción inversa.

Esta etapa debe realizarse en la zona pre-PCR.

Reactivos necesarios.

- 5X Vilo reaction mix, 10X super script (SuperScript Vilo cDNA Synthesis Kit), agua Nuclease free, extracto de ARN total para análisis (25 a 250 ng/μL).



Se recomienda realizar todo el procedimiento en tubos o placas de PCR de 200 μL.

Transcripción inversa.

- Descongele los siguientes reactivos y consérvelos en hielo o en un soporte de refrigeración: 5X Vilo reaction mix y 10X super script.
- Prepare una mezcla de transcripción inversa. Para cada muestra, mezcle (para un volumen total de 3 μL por reacción) :

○ 5X Vilo reaction mix	1 μL
○ Nuclease free agua	1 μL
○ 10X super script	0,5 μL
- Dispense esta mezcla en tubos de PCR de 200 μL (2,5 μL por tubo) mantenidos en hielo o en un soporte de refrigeración.
- Añada 2,5 μL de cada una de las soluciones de ARN total a los distintos tubos.
- Agite en el vórtex y centrifugue brevemente.
- Coloque los tubos en el termociclador situado en la zona pre-PCR y proceda con la **etapa 1 del programa pre-PCR** (transcripción inversa de ARN a ADNc).



A continuación, proceda directamente a la etapa 2 o conserve los productos de ligación a una temperatura entre –30 °C y –15 °C.

Etapas 2: Hibridación de las sondas.

Esta etapa debe realizarse en la zona pre-PCR.

Reactivos necesarios.

- Mezcla de sondas **GENEXPATH SarcomaFusion** GEP- SFPM), SALSA MLPA Buffer

Hibridación de las sondas.

- **Al final de la etapa 1**, cuando la temperatura del termociclador haya descendido a 4 °C, retire los tubos, centrifúguelos brevemente y colóquelos en hielo o en un soporte de refrigeración.
- Descongele el tampón Salsa MLPA Buffer y la mezcla de sondas **GENEXPATH SarcomaFusion** y consérvelos en hielo o en un soporte de refrigeración.
- Prepare una mezcla de hibridación. Para cada muestra, mezcle (para un volumen total de 3 µL por reacción) :
 - Salsa MLPA Buffer 1,5 µL
 - Mezcla de sondas **GENEXPATH SarcomaFusion** 1,5 µL
- Agite en el vórtex y centrifugue brevemente.
- Añada 3 µL de esta mezcla a cada tubo de ADNc.
- Centrifugue brevemente.
- Vuelva a colocar los tubos en el termociclador.
- Compruebe la temperatura de la tapa calefactora (95 °C).
- Proceda a la **etapa 2 del programa pre-PCR** (hibridación de las sondas).

Etapa 3: Ligación.

Esta etapa debe realizarse en la zona pre-PCR.

Reactivos necesarios.

- SALSA Ligase Buffer A, SALSA Ligase Buffer B, SALSA Ligase 65, Nuclease free agua.

Ligación.

- 15 minutos antes del final de la etapa 2, descongele los tampones SALSA Ligase Buffer A y SALSA Ligase Buffer B y consérvelos en hielo o en un soporte de refrigeración.
- Coloque la enzima SALSA Ligase 65 en hielo o en un soporte de refrigeración.
- Prepare una mezcla de ligación. Para cada muestra, mezcle (para un volumen total de 32 µL por reacción) :
 - Nuclease free agua 25 µL
 - Salsa Ligase Buffer A 3 µL
 - Salsa Ligase Buffer B 3 µL
- Agite en el vórtex y centrifugue brevemente
 - Salsa Ligase 65 1 µL
- Agite en el vórtex y centrifugue brevemente.
- Después de 60 minutos de incubación, proceda a la **etapa 3 del programa pre-PCR (ligación)**.
- Reduzca la temperatura del bloque calefactor a 54 °C.
- Añada 32 µL de la mezcla de ligación directamente a cada tubo, sin sacarlos del bloque calefactor.
- Después de distribuir la mezcla, pase a la siguiente etapa del programa (15 minutos a 54 °C, 5 minutos a 98 °C).



Al final de esta etapa, cuando la temperatura del bloque de PCR haya descendido a 4 °C, proceda inmediatamente a la etapa 4 (amplificación por PCR) o congele los productos de ligación (hasta una temperatura entre –30 °C y –15 °C).



Después de esta etapa, no almacene los productos a temperaturas más altas (por ejemplo, 4 °C o temperatura ambiente) para evitar ligaciones no específicas que pudieran derivarse de la actividad enzimática residual.

Etapa 4: Amplificación e incorporación de códigos de barras y adaptadores.

En esta etapa, los productos de ligación se amplifican por PCR utilizando las colas adicionales en los extremos de las sondas. Estas amplificaciones se realizan utilizando los pares de cebadores proporcionados en los tubos de Código de barras **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BC-xxx).

Para permitir el análisis de múltiples muestras en una sola celda de flujo, el cebador de PCR 3' lleva un código de barras molecular que será reconocido por el algoritmo de demultiplexación de la plataforma **GENEXPATH RT-MIS**.

Para realizar el control interno con las sondas GAPDH, se realizan dos PCR diferentes, por lo que hay que duplicar el número de tubos. Para una muestra determinada, debe utilizarse el mismo número xxx de códigos de barras GEP-BC-xxx y GEP-BCC-xxx para el análisis informático. Por tanto, para cada muestra, debe añadirse el código de barras GEP-BC-xxx a un tubo y el código de barras GEP-BCC-xxx asociado al otro.

Reactivos necesarios.

- Códigos de barras **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BC-xxx), Códigos de barras GAPDH **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BCC-xxx), Red'y' Star PCR Mix, agua Nuclease free.

Amplificación.

- Prepare una mezcla de amplificación en la zona pre-PCR. Para cada muestra, mezcle (para un volumen total de 18 µL por reacción) :
 - Red'y' Star PCR Mix 12,5 µL
 - Agua Nuclease free 5,5 µL
- Agite en el vórtex y centrifugue brevemente.
- Dispense 18 µL de esta mezcla de amplificación en diferentes pocillos de una placa de PCR.
- Añada 5 µL de los productos de ligación generados en la etapa 3 a cada pocillo.
- Añada 2 µL de Código de barras **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BC-xxx o GEP-BCC-xxx, según la prueba).



Utilice diferentes códigos de barras GEP-BC-xxx para cada una de las muestras analizadas, pero para una misma muestra utilice el mismo número para GEP-BC-xxx y GEP-BCC-xxx.

- Coloque la placa en el termociclador en la zona post-PCR.
- Inicie el **programa 2** (PCR).



Al final del programa, cuando la temperatura del termociclador haya descendido a 4 °C, proceda rápidamente a la etapa 5 (purificación) o congele los productos de amplificación a una temperatura entre –30 °C y –15 °C.



No conserve estos productos durante periodos prolongados a temperaturas más altas (por ejemplo, a 4 °C en el termociclador o a temperatura ambiente).

Etapas 5: Purificación y análisis de las bibliotecas de secuenciación.

Tras la etapa de amplificación, las bibliotecas de secuenciación deben purificarse para eliminar los cebadores de la PCR y los nucleótidos no incorporados. Esta purificación se realiza con marmoles magnéticas AMPure XP. A continuación, las bibliotecas deben analizarse por fluorimetría con el kit Qubit® dsDNA HS antes de cargarlas en el secuenciador.

Reactivos necesarios.

- Etanol 100 %, Nuclease free agua, marmoles AMPure XP, tampón TE (10 mM de Tris-acetato pH 8,0, 1 mM de EDTA), Qubit® dsDNA HS Assay.

Etapas 5.a: Purificación de las bibliotecas de secuenciación.



Asegúrese de que las marmoles estén completamente resuspendidas antes de su uso.

- Purificar 25 µL de productos de PCR con 45 µL de marmoles AMPure XP (siguiendo las recomendaciones del proveedor).
- Eluir los productos de PCR purificados en 50 µL de tampón TE.



Tras la purificación, las bibliotecas pueden conservarse a una temperatura entre –30 °C y –15 °C antes de la secuenciación.

Etapas 5.b: Análisis de las bibliotecas de secuenciación.

- Analice 10 µL de cada biblioteca de secuenciación por fluorimetría con el producto Qubit® dsDNA HS Assay.

Etapas 6: Dilución, pool y secuenciación de las bibliotecas.

Tras la purificación, las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** deben diluirse, agruparse y cargarse en el secuenciador.



Para obtener resultados óptimos, debe leerse un mínimo de 10⁵ secuencias para cada muestra.

A diferencia de la mayoría de las bibliotecas de secuenciación convencionales, la read de los códigos de barras moleculares necesarios para demultiplexar las secuencias de **GENEXPATH SarcomaFusion** se realizan durante la read1. Por tanto, estas secuencias no se demultiplexan



automáticamente por el secuenciador y se guardarán en los archivos fastQ «Undetermined». La demultiplexación se realiza mediante el algoritmo específico proporcionado en la plataforma **GENEXPATH RT-MIS**.

Reactivos necesarios.

- Cebador de secuenciación **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001), cebadores de secuenciación de control **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-002) (si se realiza un control interno), reactivos de secuenciación Illumina

Secuenciación en un secuenciador Illumina MiSeq.

Para obtener información detallada sobre la dilución y desnaturalización de las bibliotecas, la preparación del cebador de secuencia, la hoja de inyección y el inicio de la secuenciación, consulte la Guía del sistema Miseq de Illumina.

• *Etapa 6.a: Dilución y pool de las bibliotecas.*

- Diluya cada una de las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** a una concentración entre 2 nM y 4 nM, asumiendo un tamaño medio de fragmentos amplificados de 150 pb.
- Agrupe las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** en un volumen equivalente.
- Si se secuencian otras bibliotecas en la misma celda de flujo, ajuste las concentraciones de los diferentes pools y combínelas posteriormente para obtener el número deseado de secuencias (un mínimo de 10^5 secuencias para cada biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion**).

Por ejemplo: para un pool de 10 bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** que requieran 1 M de secuencias (10^5 secuencias para cada biblioteca), secuenciadas con un pool de bibliotecas B a la misma concentración y que requieran 3 M de secuencias, mezcle 1 μ L del pool de bibliotecas **GENEXPATH Sarcoma Fusion** y 3 μ L del pool de bibliotecas B.

• *Etapa 6.b: Desnaturalización y dilución del pool de bibliotecas.*

- Desnaturalice y diluya el pool final según las recomendaciones de la Guía del Sistema Miseq de Illumina hasta alcanzar una concentración de carga final de 8-10 pM.

• *Etapa 6.c: Preparación de los cebadores de secuenciación.*

- Si el pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** se secuencia solo, diluya 3 μ L de cada cebador de secuenciación **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 y GEP-SP-002, si se trata de un control interno) en un volumen final de 600 μ L de tampón HT1 y, a continuación, coloque estos 600 μ L en el pocillo 18 del cartucho de reactivos del sistema MiSeq.

- Si el pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** está cargado con otras bibliotecas secuenciadas con cebadores de secuenciación Illumina, traslade con una pipeta todo el contenido del pocillo 12 (aproximadamente 600 µL), añada 3 µL de cada cebador de secuenciación **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 y GEP-SP-002, si es un control interno) y vuelva a dispensar esta mezcla en el pocillo 18 del cartucho.

- **Etapa 6.d: Preparación de la hoja de inyección.**

- Si la biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion** se secuencia sola, realice la hoja de inyección para generar los FASTQ con 120 ciclos en la read1.
- Si las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** se combinan con otras bibliotecas de secuenciación, genere la hoja de inyección utilizando los parámetros habituales, sin introducir las muestras **GENEXPATH SarcomaFusion**.
- Especifique el uso de un cebador personalizado al configurar la serie (con «Local Run Manager», en la página «Create Run»). En el modo de ejecución manual, en la pantalla «Run Setup»).



En todos los casos, asegúrese de que la read 1 se realice con un mínimo de 120 ciclos y que se seleccione la casilla «Custom Primer for Read 1».

- En todos los casos, las secuencias de las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** no se demultiplexarán por el secuenciador, sino que se guardarán en el archivo FastQ «Undetermined», que deberá cargarse en la plataforma **GENEXPATH RT-MIS**.

- **Etapa 6.e: Lanzamiento de la secuenciación.**

- Inicie la secuenciación tal como se indica en la Guía del sistema MiSeq de Illumina.

Secuenciación en una plataforma Illumina NextSeq 500/550.

Para obtener información detallada sobre la dilución y desnaturalización de las bibliotecas, la preparación del cebador de secuencia, la hoja de inyección y el inicio de la secuenciación, consulte la Guía del sistema NextSeq de Illumina.

- **Etapa 6.a: Dilución y pool de las bibliotecas.**

- Diluya cada una de las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** a una concentración entre 0,5 nM y 4 nM, asumiendo un tamaño medio de fragmentos amplificados de 150 pb.
- Agrupe las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** en un volumen equivalente.
- Si se secuencian otras bibliotecas en la misma Flowcell, ajuste las concentraciones de los diferentes pools y combínelas posteriormente para obtener el número deseado de secuencias (un mínimo de 10⁵ secuencias para cada biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion**).

Por ejemplo: para un pool de 10 bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** que requieran 1 M de secuencias (10^5 secuencias para cada biblioteca), secuenciadas con un pool de bibliotecas B a la misma concentración y que requieran 3M de secuencias, mezcle 1 μ L del pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** y 3 μ L del pool de bibliotecas B.

- ***Etapas 6.b: Desnaturalización y dilución del pool de bibliotecas.***

- Desnaturalice y diluya el pool final según las recomendaciones de la Guía del Sistema NextSeq de Illumina hasta una concentración de carga final de 0,8 pM a 1 pM.

- ***Etapas 6.c: Preparación de los cebadores de secuenciación.***

- Si el pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** se está secuenciando solo, diluya 6 μ L de cada cebador de secuenciación **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 y GEP-SP002, si es un control interno) en un volumen final de 2000 μ L de tampón HT1 y, a continuación, coloque estos 2 mL en el pocillo 7 del cartucho de reactivos del NextSeq.
- Si el pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** se combina con otras bibliotecas secuenciadas con cebadores de secuenciación Illumina, traslade con una pipeta todo el contenido del pocillo 20 (aproximadamente 2 mL), añada 6 μ L de cada cebador de secuenciación **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 y GEP-SP-002, si es un control interno) y vuelva a dispensar esta mezcla en el pocillo 7 del cartucho.

- ***Etapas 6.d: Preparación de la hoja de inyección.***

- Si la biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion** se secuencia sola, realice la hoja de inyección para generar los FASTQ con 120 ciclos en la read 1.
- Si las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** se combinan con otras bibliotecas de secuenciación, genere la hoja de inyección utilizando los parámetros habituales, sin introducir las muestras **GENEXPATH SarcomaFusion**.
- Especifique el uso de un cebador personalizado al configurar la serie (con «Local Run Manager», en la página «Create Run»). En el modo de ejecución manual, en la pantalla «Run Setup»).



En todos los casos, asegúrese de que la read 1 se realice con un mínimo de 120 ciclos y que se seleccione la casilla «Custom Primer for Read 1».

- En todos los casos, las secuencias de las bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** no se demultiplexarán por el secuenciador, sino que se guardarán en los cuatro archivos FastQ «Undetermined», que deberán cargarse en la plataforma **GENEXPATH RT-MIS**.

- ***Etapas 6.e: Lanzamiento de la secuenciación.***

- Inicie la secuenciación tal como se describe en la Guía del sistema NextSeq de Illumina.

Etapa 7: Análisis de los resultados.

Los archivos de secuencias generados por las plataformas de secuenciación Illumina (MiSeq o NextSeq) en formato FastQ deben analizarse con el *software* **GENEXPATH RT-MIS**, disponible *online* en <https://connect.genexpath.com/>.



Para facilitar la descarga del archivo FastQ, este no debe descomprimirse (fastq.gz).

Este *software* es una solución bioinformática completa que integra varios algoritmos de tratamiento de datos. Asimismo, realiza el demultiplexado que permite la asignación de secuencias a cada muestra. A continuación, realiza una identificación precisa de los marcadores de expresión génica y su cuantificación.

La prueba **GENEXPATH SarcomaFusion** se basa en la cuantificación de marcadores cualitativos que caracterizan la presencia o ausencia de translocaciones cromosómicas.

GENEXPATH RT-MIS genera informes concisos y transparentes, que abarcan desde la configuración de las reacciones de secuenciación hasta el análisis automatizado de sus resultados.

GENEXPATH RT-MIS requiere la carga de los archivos del secuenciador en formato FASTQ, así como la lista de códigos de barras utilizados en la prueba.

GENEXPATH RT-MIS evalúa la calidad de la secuenciación de cada muestra cuantificando el número de reads identificadas y el número de UMI (identificadores moleculares únicos, por sus siglas en inglés) detectados.

GENEXPATH RT-MIS genera un informe de análisis para cada muestra, en el que se indica la presencia o ausencia de un transcrito de fusión, el número de reads e UMI obtenidos y una referencia bibliográfica correspondiente al transcrito (en caso de que se haya detectado una fusión). Estos datos están disponibles para su descarga.

GENEXPATH RT-MIS incluye un manual de usuario que puede consultarse directamente *online* para facilitar el uso de la herramienta, describir todos los resultados generados y detallar su presentación.

GENEXPATH no almacena permanentemente los resultados generados por el *software* **GENEXPATH RT-MIS**. Los datos deben descargarse directamente después de cada análisis y almacenarse por el usuario en su sistema de gestión documental.

Limitaciones del procedimiento

- La prueba SarcomaFusion se desarrolló a partir de datos de la literatura para detectar las transcripciones de fusión más comunes en pacientes con sarcoma. Está diseñado para su uso en FFPE o muestras congeladas, posiblemente obtenidas de biopsias con aguja.

-Las prestaciones demostradas en el apartado «Caracterización de las prestaciones» se han validado con arreglo al procedimiento expuesto anteriormente.

-Una pequeña cantidad de ARN o una muestra de baja calidad pueden conducir a un resultado no interpretable.

-La secuenciación debe realizarse con secuenciadores de tecnología Illumina (Miseq y NextSeq).

Caracterización de las prestaciones

Prestaciones analíticas

Para demostrar las prestaciones analíticas de la prueba SarcomaFusion GENEXPATH, se evaluaron 4 ARN extraídos de muestras FFPE (3 positivas y 1 negativa) y 3 ARN extraídos de muestras congeladas (todos positivos) de pacientes con sarcoma y 2 líneas celulares (muestras negativas). Los resultados previstos se resumen en la Tabla 1. Tras el análisis con el *software* analítico RT-MIS, los resultados se obtuvieron según el procedimiento descrito en estas instrucciones de utilización y se resumen en la Tabla 2.

En virtud de estos resultados, la prueba SarcomaFusion proporciona una alta sensibilidad y especificidad para la detección de los transcritos de fusión asociados al sarcoma.

Tabla 1: Resumen de los resultados previstos

Muestra	Fusión esperada	Valores predictivos	
Muestra 1	EWSR1 exón 7 - CREB1 exón 7	Verdadero positivo (VP)	6
Muestra 2	JAZF1 exón 3 - SUZ12 exón 2	Verdadero negativo (VN)	3
Muestra 3	Muestra 3	Valor predictivo positivo (%)	100 %
Muestra 4	negativo	Exhaustividad (%)	100 %
Muestra 5	SS18 exón 10 - SSX exón 6	Tasa de falsos positivos (%)	0 %
Muestra 6	PAX3_7 exón 7 - FOXO exón 2	Sensibilidad (%)	100 %
Muestra 7	EWSR1 exón 7 - FLI1 exón 6	Falso positivo (FP)	0
Línea celular 1	negativo	Falso negativo (FN)	0

Línea celular 2	negativo	Valor predictivo negativo (%)	100 %
		Precisión (%)	100 %
		Tasa de falsos negativos (%)	0 %
		Especificidad (%)	100 %

Los resultados demuestran que la prueba SarcomaFusion proporciona una alta sensibilidad y especificidad para la detección de transcripciones de fusión asociadas con el sarcoma.

Rendimiento analítico en una cohorte de pacientes

Un estudio publicado en 2022 sobre 158 muestras de tumores óseos y tejidos blandos (Lanic MD et al., Modern Pathology, 2022) demostró las siguientes actuaciones:

Sensibilidad = 98,1 %

Especificidad = 100

En este artículo, los autores informan que las pocas anomalías no detectadas por la prueba SarcomaFusion se explican por:

- La presencia de translocaciones raras o complejas no cubiertas por la prueba SarcomaFusion
- La baja calidad y cantidad de ARN de algunas muestras

Repetibilidad

La repetibilidad de la prueba SarcomaFusion se define como su capacidad para cuantificar con precisión una transcripción de fusión esperada. Se realizaron dos pruebas:

- Una prueba para probar la repetibilidad de los resultados de 3 muestras dentro de la misma ejecución
- Un segundo para probar la repetibilidad de los resultados de 5 muestras en 3 series diferentes.

Repetibilidad intra-run

Se estudiaron 3 muestras analizadas en triplicata mediante el test SarcomaFusion (Figura 1). Los datos de conteo para cada anomalía según las réplicas son perfectamente comparables.

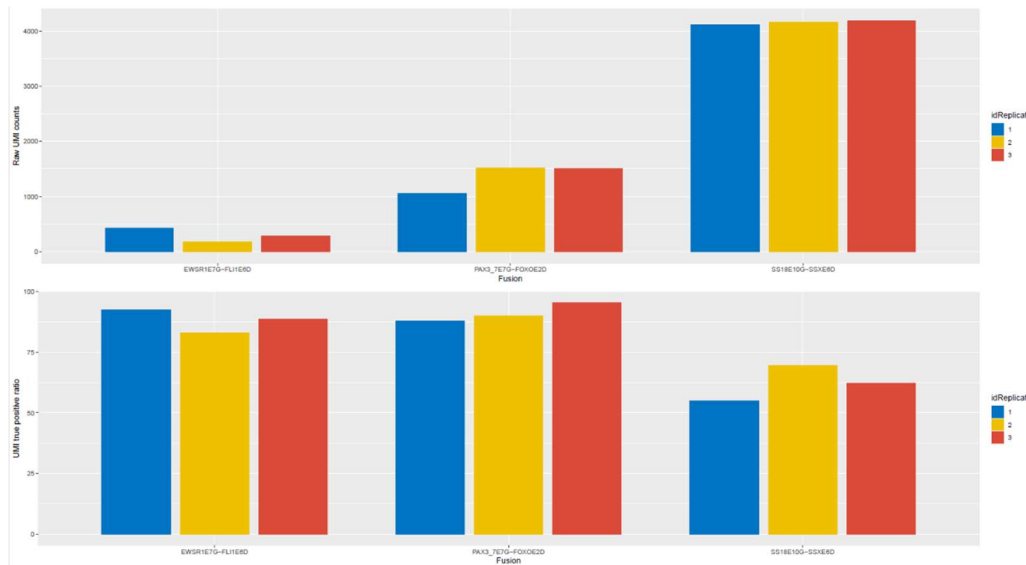


Figura 1: Los histogramas representan en la parte superior el número bruto de UMI detectados y en la parte inferior en relación con el número total de UMI en la muestra en función de la fusión esperada y las réplicas.

Repetibilidad intra-run

Se estudiaron 5 muestras analizadas por la prueba SarcomaFusion en 3 series diferentes (Figura 2). Los datos de recuento para cada anomalía son perfectamente comparables.

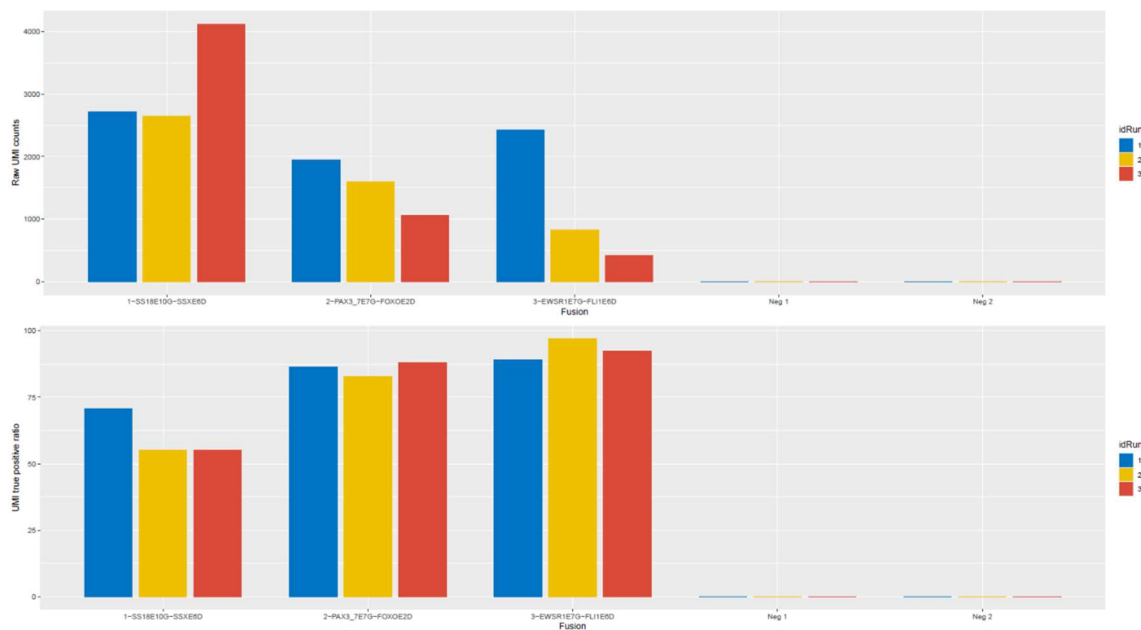


Figura 2: Los histogramas representan en la parte superior el número bruto de UMI detectados y en la parte inferior en relación con el número total de UMI en la muestra de acuerdo con la fusión y ejecución esperadas.

Repetibilidad

La reproducibilidad se refiere a la capacidad de la prueba SarcomaFusion para detectar translocaciones entre diferentes usuarios en condiciones idénticas.

Para evaluar este parámetro, se analizaron 5 muestras por 3 usuarios diferentes:

- 3 muestras positivas (SS18 exón 10 – exón SSX 6, PAX3_7 exón 7 – FOXO exón 2, EWSR1 exón 7 – FLI1 exón 6)
- 2 muestras negativas (líneas celulares)

Los datos, que se muestran en la Figura 3, muestran una cuantificación reproducible entre diferentes usuarios.

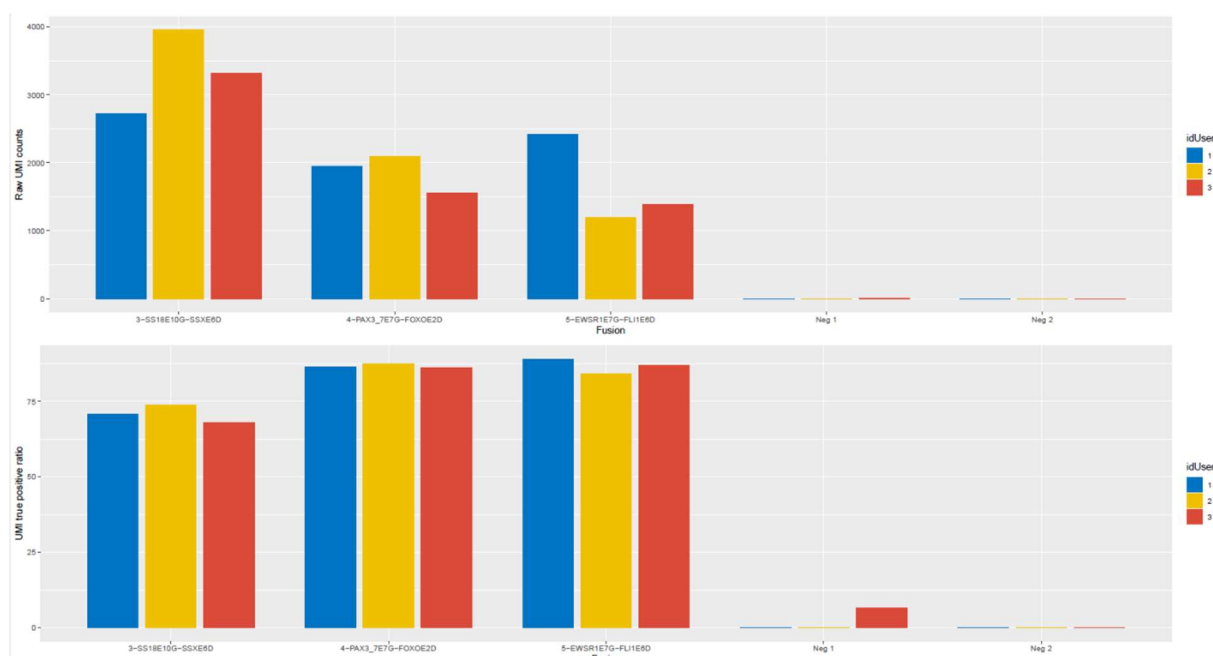


Figura 3: Los histogramas representan en la parte superior el número bruto de UMI detectada y en la parte inferior en relación con el número total de UMI en la muestra según la fusión esperada y el usuario.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del ensayo SarcomaFusion se define como su capacidad para detectar translocaciones en función de la cantidad de ARN en la muestra y el porcentaje de células tumorales en la muestra.

Para determinar estos dos límites de sensibilidad, se realizaron dos diluciones seriadas a partir de 2 muestras:

- Dilución en agua para simular una disminución del ARN
- Una dilución de la muestra que se analizará en ARN universal para simular una disminución en el enriquecimiento tumoral

Los resultados se muestran en la Figura 4. La dilución de dos muestras de control a cantidades iniciales de 529 y 489 ng de ARN en agua de nucleasa libre muestra que las fusiones esperadas todavía se detectan a cantidades de ARN de 4 ng. Incluso si la cuantificación de anomalías es una función del enriquecimiento tumoral de la muestra analizada, el límite obtenido está muy por debajo de las recomendaciones para el uso de la prueba SarcomaFusion (entre 50 y 500 ng).

El segundo rango de diluciones realizadas a partir de dos muestras positivas y ARN universal muestra que las anomalías esperadas siempre se detectan al 3% de la muestra tumoral. Con ARN positivo al 0%, la prueba ya no detecta ningún rastro de fusiones.

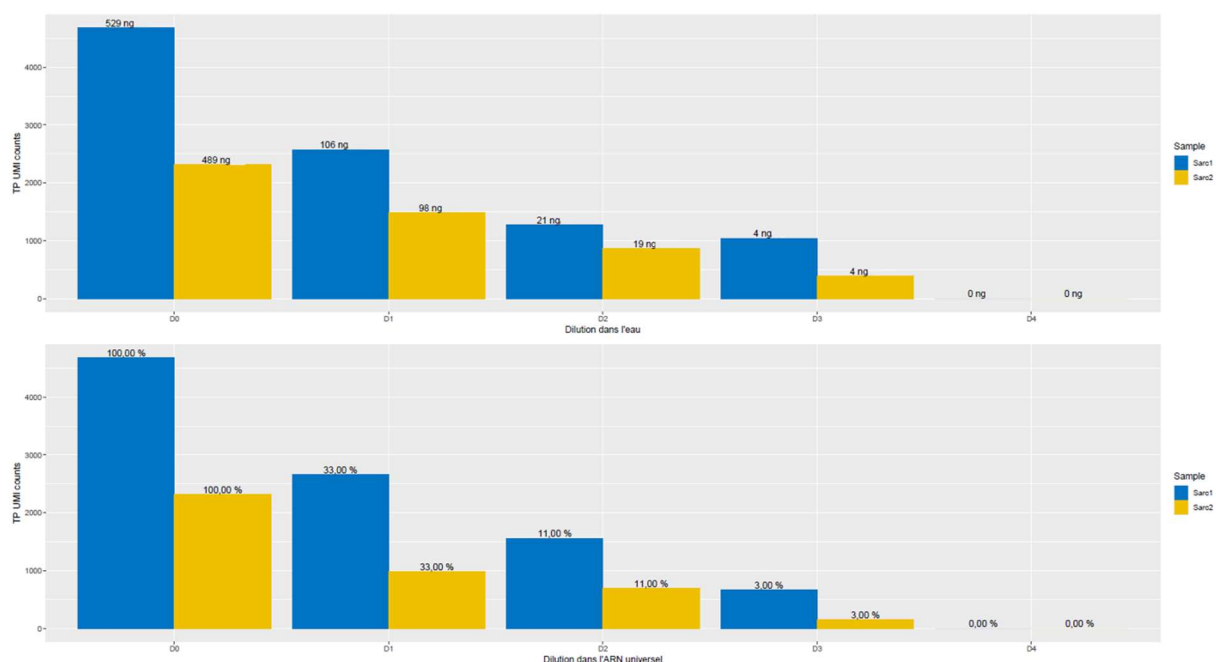


Figura 4: Los histogramas representan el número bruto de UMI detectados de fusiones esperadas en dos muestras basadas en rangos de dilución en agua (arriba) o ARN universal (abajo).

Bibliografía

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).

Tabla de símbolos

 Fabricante	 Nombre del reactivo
 Fecha de fabricación	 Límite de temperatura
 Fecha de caducidad	 Consulte las instrucciones de uso
 Código de lote	 Marcado CE - Conformidad europea
	 Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>

Notas

Los reactivos **GENEXPATH SarcomaFusion** están protegidos por derechos de propiedad intelectual, por lo que queda prohibida su modificación, reproducción, venta o transmisión sin la autorización del fabricante.

La información contenida en este documento está sujeta a cambios.