



# SarcomaFusion

<b>ENGLISH .....</b>	<b>2</b>
<b>FRANCAIS.....</b>	<b>25</b>
<b>DEUTSCH.....</b>	<b>49</b>
<b>ESPAÑOL .....</b>	<b>73</b>
<b>ITALIANO .....</b>	<b>97</b>
<b>PORTUGUÊS .....</b>	<b>121</b>



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

[support@genexpath.com](mailto: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:.....	8
Required equipment:.....	9
Before starting.....	9
Biological samples.....	9
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.....	11
Required reagents.....	12
Hybridization of probes.....	12
Step 3: Ligation.....	12
Required reagents.....	12
Ligation.....	12
Step 4: Amplification and incorporation of barcodes and adapters.....	13
Required reagents.....	13
Amplification.....	14
Step 5: Purification and assay of sequencing libraries.....	14
Required reagents.....	14
Step 5.a: Purification of sequencing libraries.....	14
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.....	15
• 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. ....	16
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.....	17
• 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 .....	19
Analytical performances on a cohort of patients .....	20
Repeatability .....	20
Repeatability intra-run .....	20
Repeatability inter-runs .....	21
Reproducibility.....	22
Analytical sensibility.....	22
Bibliography.....	23
Table of symbols.....	24
Notes.....	24

## 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](mailto:contact@genexpath.com)
- Any serious incident occurring in connection with the device must be notified to us at [contact@genexpath.com](mailto: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.

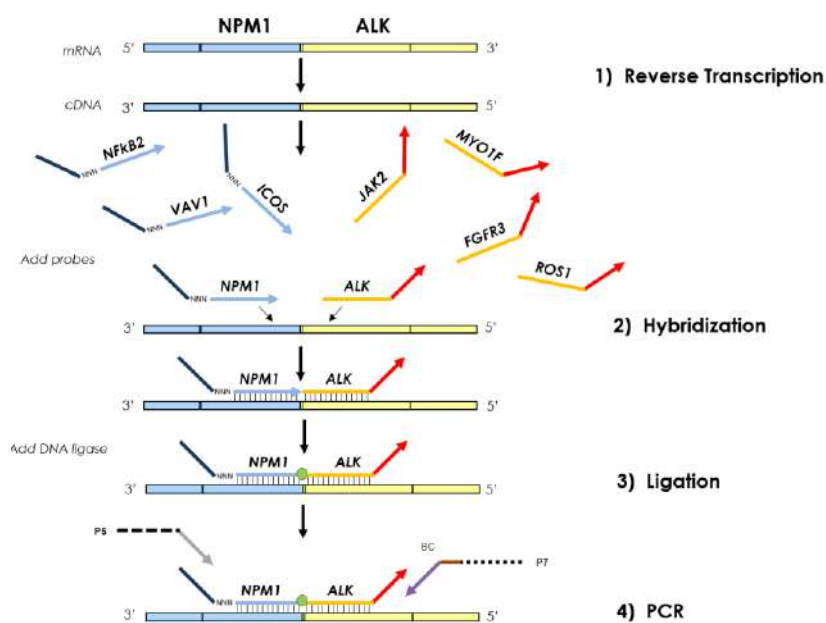
The fastQ files generated using this test contain data about counting sequences corresponding to the potential presence of a fusion transcript, i.e. ligation of two probes and their amplification.

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.

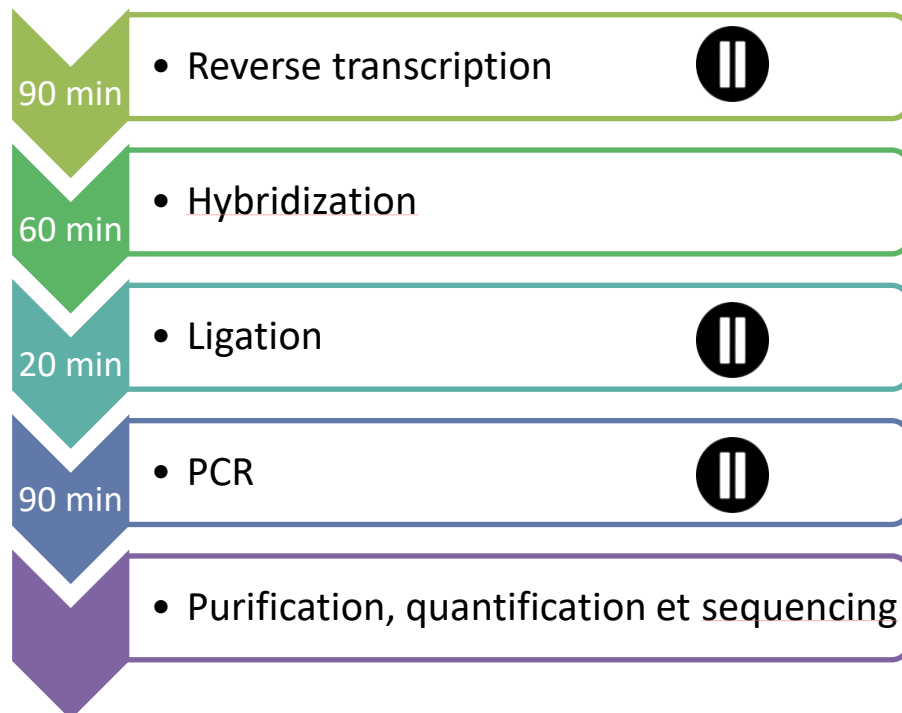
## Test principle.

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.

<b>GENEXPATH SarcomaFusion</b> probe mix	GEP-SFPM
<b>GENEXPATH SarcomaFusion</b> barcodes	GEP-BC-xxx
<b>GENEXPATH SarcomaFusion</b> sequencing primer	GEP-SP-001

---

<b>GENEXPATH SarcomaFusion</b> GAPDH barcodes	GEP-BCC-xxx
---	-------------

XXX: barcode number

On receipt, these reagents should be stored between -25°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
<b>GEP-SFPM</b> probe mix	30 µL	48 µl	54 µl	108 µL
Barcodes <b>GEP-BC-xxx (from 001 to 032 depending on number of analyses purchased)</b> BC=barcode	8 BC N°017 to 024 5 µL/BC	8 BC N°001 to 008 9 µL/BC	12 BC N°021 to 032 9 µL/BC	24 BC N°001 to 024 9 µL/BC
<b>GEP-SP-001</b> sequencing primers	60 µL	96 µL	144 µL	288 µL
<b>For the internal control</b>				
GAPDH barcodes <b>GEP-BCC-xxx (from 001 to 032 depending on number of analyses purchased)</b> BCC=control barcode	8 BCC N°017 to 024 5 µL/BCC	8 BCC N°001 to 008 9 µL/BCC	12 BCC N°021 to 032 9 µL/BCC	24 BCC N°001 to 024 9 µL/BCC
GAPDH sequencing primers <b>GEP-SP-002</b>	60 µL	96 µL	144 µL	288 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
<b>SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit</b>	Invitrogen, ref 11754250
<b>SALSA MLPA Buffer</b>	MRC Holland, ref SMR33
<b>SALSA Ligase Buffer A</b>	MRC Holland, ref SMR12
<b>SALSA Ligase Buffer B</b>	MRC Holland, ref SMR13



<b>SALSA Ligase 65</b>	MRC Holland, ref SMR20
<b>Red'y' Star PCR Mix</b>	Eurogentec, ref PK-0073-02R
<b>AMPure XP (Magnetic beads)</b>	Beckman Coulter, ref A63880
<b>Qubit® dsDNA HS Assay</b>	Fisher Scientific, ref 10616763
<b>Sequencing reagents</b>	Illumina
<b>TE buffer (10 mM Tris-Acetate pH 8.0, 1mM EDTA)</b>	Variable
<b>Ethanol 100%</b>	Variable
<b>NaOH 1 N</b>	Variable
<b>Tris Buffer 200 mM pH 7</b>	Variable
<b>Nuclease-Free Water</b>	Variable

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

### Required equipment:

<b>Equipment</b>	<b>Suppliers and references</b>
<b>Thermocycler in pre-PCR zone</b>	Variable
<b>Thermocycler in post-PCR zone</b>	Variable
<b>Qubit® Fluorometer (or equivalent)</b>	Thermo Fisher Scientific, ref Q33238
<b>Qubit® Assay Tubes</b>	Fisher Scientific, ref 12037609
<b>DynaMag™-96 Side Magnet - Magnetic plate (AMPure XP purification)</b>	Thermo Fisher Scientific, ref 12331D
<b>PCR 200 µL plates and tubes</b>	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 2.5 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 2.5 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 -25°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  $\mu$ L
- Vortex, centrifuge briefly
- Salsa Ligase 65 1  $\mu$ L
- 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  $\mu$ L 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).

**II** 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 -25°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):
  - Red'y' Star PCR Mix 12.5 µL
  - 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 -25°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 -25°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 10<sup>5</sup> 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<sup>5</sup> 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  $\mu\text{L}$  of the **GENEXPATH SarcomaFusion** libraries pool and 3  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  of each **GENEXPATH SarcomaFusion** sequencing primer (GEP-SP-001 and GEP-SP-002, if internal control) in a final volume of 600  $\mu\text{L}$  of HT1 buffer, then place this 600  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ ), add 3  $\mu\text{L}$  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  $\mu$ L of the **GENEXPATH SarcomaFusion** libraries pool and 3  $\mu$ 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  $\mu$ L of each **GENEXPATH SarcomaFusion** sequencing primer (GEP-SP-001 and GEP-SP002, if internal control) in a final volume of 2000  $\mu$ 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  $\mu$ 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%

<b>sample 6</b>	PAX3_7 exon 7 – FOXO exon 2 <i>PAX3_7 exon 7 – FOXO exon 2</i>	Sensitivity	100%
<b>sample 7</b>	EWSR1 exon 7 – FLI1 exon 6 <i>EWSR1 exon 7 – FLI1 exon 6</i>	False positive	0
<b>cell line 1</b>	Negative <i>No fusion detected</i>	False negative	0
<b>cell line 2</b>	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.

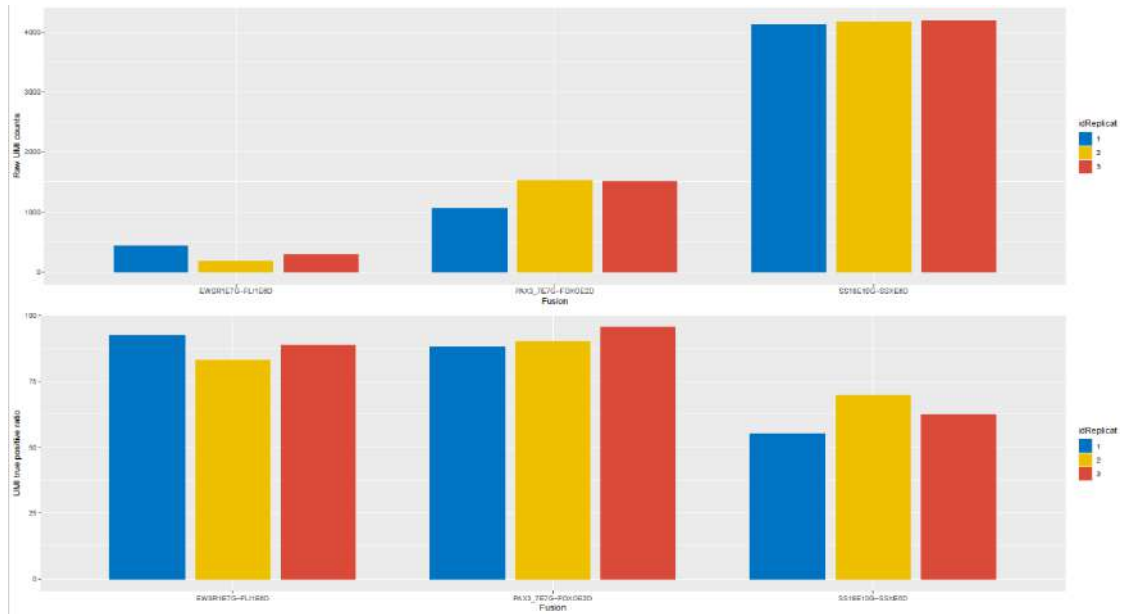


Figure 1: The histograms represent at the top the raw number of UMIs detected and at the bottom the raw number of UMIs related to the total number of UMIs of the sample according to the expected fusion and the replicas.

- **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.

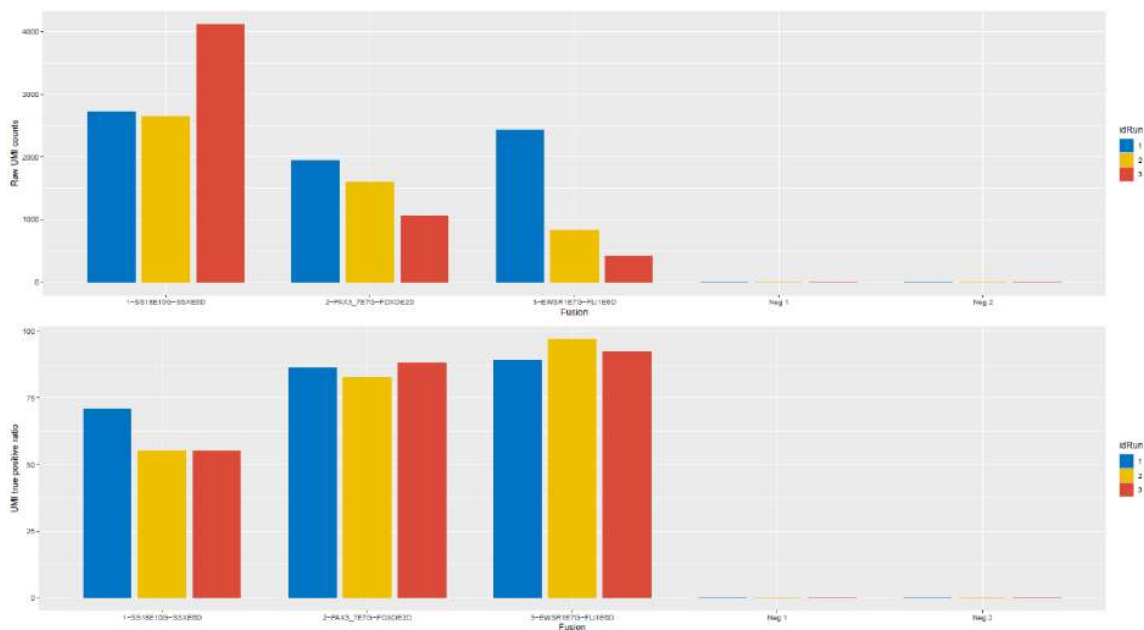


Figure 2: The histograms represent at the top the raw number of UMI detected and at the bottom the raw number of UMI related to the total number of UMI of the sample according to the expected fusion and the run.

## 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.

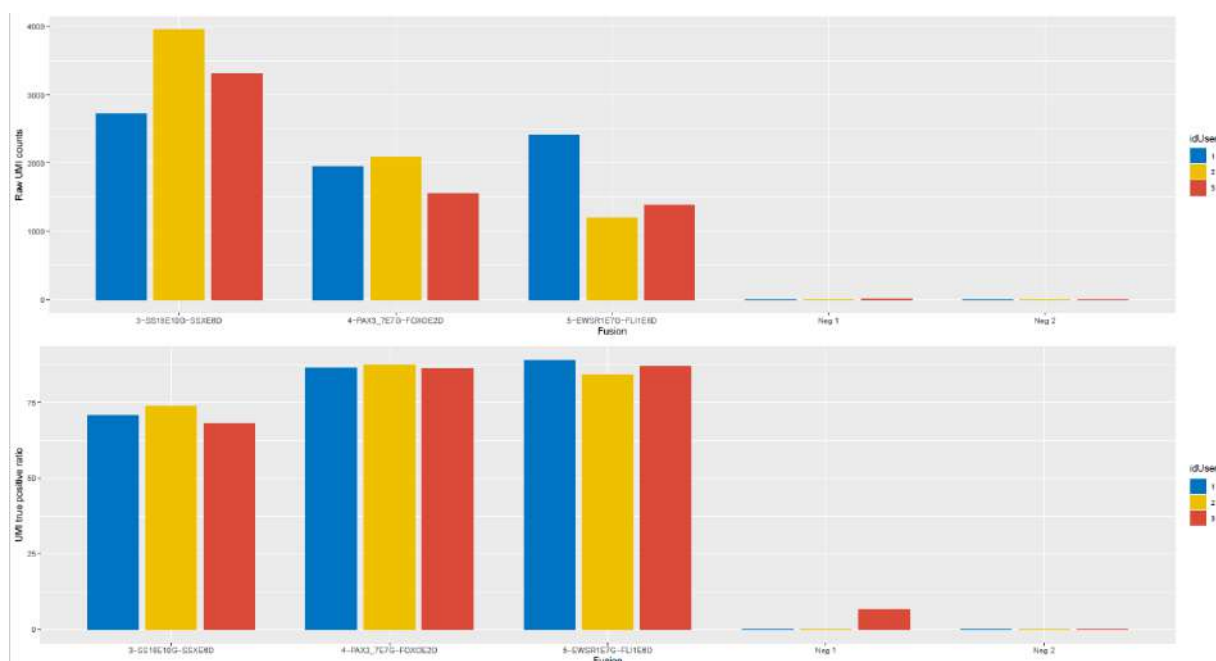


Figure 3: The histograms represent at the top the raw number of UMI detected and at the bottom the raw number of UMI related to the total number of UMI of the sample according to the expected fusion and the user.

## 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.

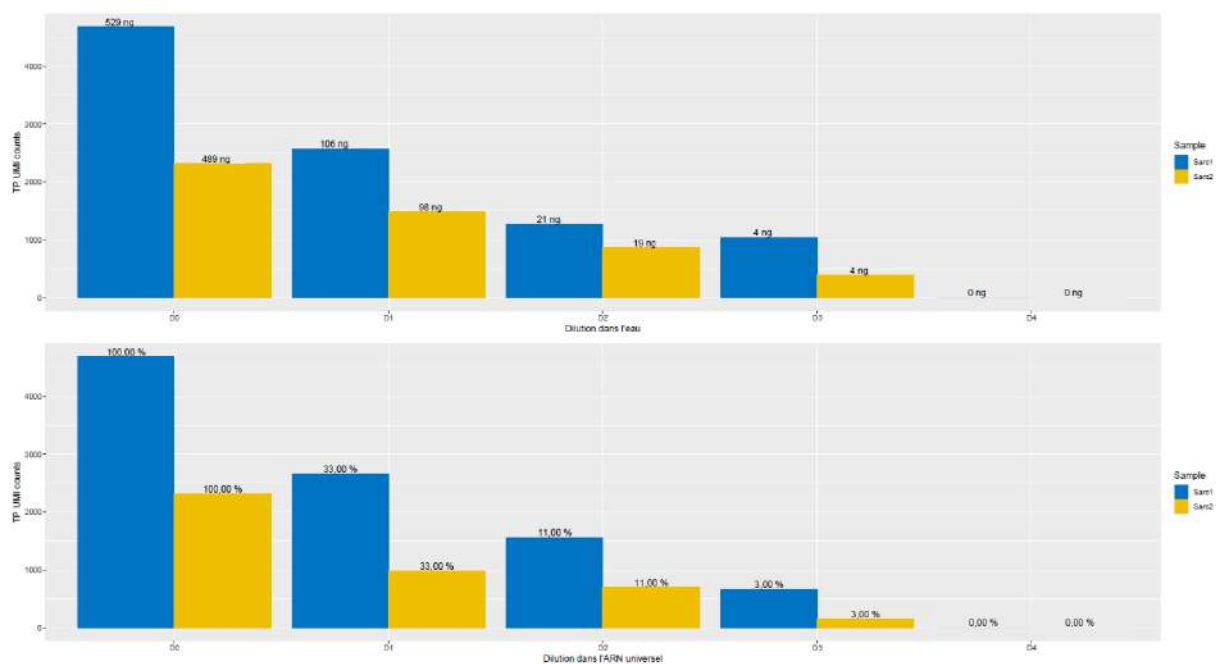











Figure 4: The histograms represent the raw number of UMIs detected from the expected fusions in two samples according to the dilution ranges carried out in water (top) or in universal RNA (bottom).

## 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</i> diagnostic medical device

## 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.**

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

**IVD** 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](mailto:contact@genexpath.com)

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

FRANCAIS.....	25
Précautions importantes. ....	28
Recommandations générales. ....	28
Pictogrammes.....	28
Utilisation prévue .....	29
Principe du test. ....	29
Réactifs. ....	31
Contenu du kit de réactifs GENEXPATH SarcomaFusion. ....	31
Format des kits de réactifs commercialisés et quantités : .....	31
Réactifs non fournis dans le kit de réactifs : .....	32
Matériels nécessaires : .....	32
Avant de commencer. ....	33
Echantillons biologiques. ....	33
Programmation des Thermocycleurs.....	33
Programme 1 : Pré PCR. ....	33
Programme 2 : PCR.....	34
Protocole détaillé.....	34
Etape 1 : Transcription inverse. ....	34
Réactifs nécessaires.....	34
Transcription inverse.....	34
Etape 2 : Hybridation des sondes. ....	35
Réactifs nécessaires.....	35
Hybridation des sondes.....	35
Etape 3 : Ligation.....	36
Réactifs nécessaires.....	36
Ligation. ....	36
Etape 4 : Amplification et incorporation des barcodes et adaptateurs. ....	37
Réactifs nécessaires.....	37
Amplification. ....	37
Etape 5 : Purification et dosage des librairies de séquençage. ....	38
Réactifs nécessaires.....	38
Etape 5.a : Purification des librairies de séquençage. ....	38
Etape 5.b : Dosage des librairies de séquençage. ....	38
Etape 6 : Dilution, pool et séquençage des librairies. ....	38
Réactifs nécessaires.....	39

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

## 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](mailto:contact@genexpath.com).
- Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif doit nous être notifié à l'adresse [contact@genexpath.com](mailto: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.

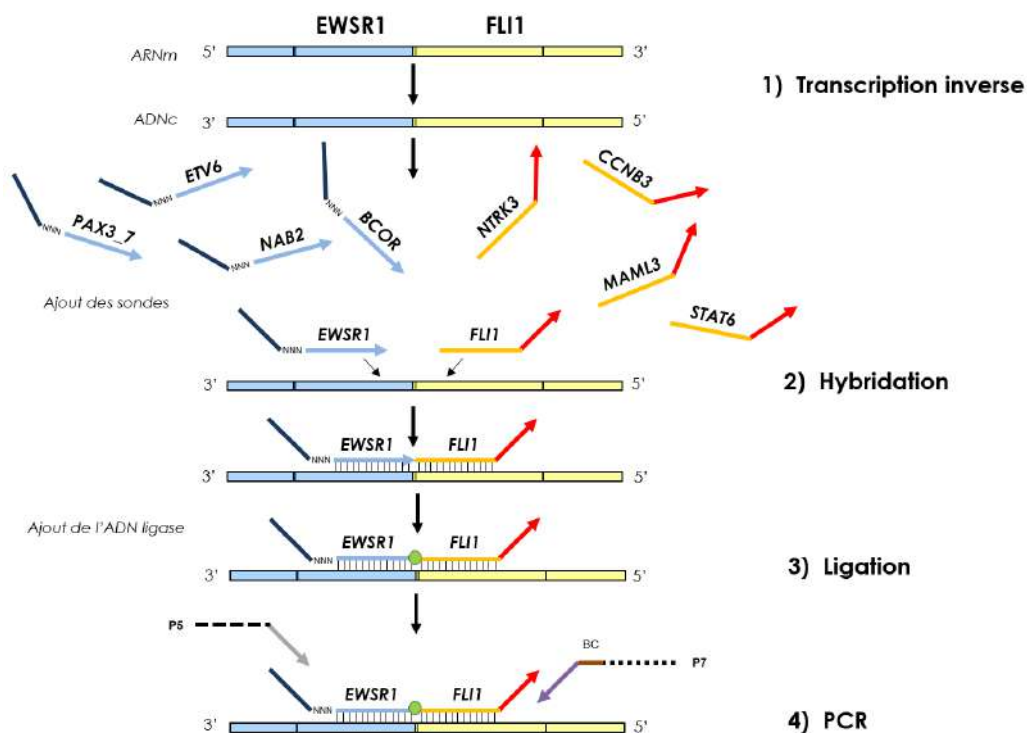
Les fichiers fastQ générés à l'aide de ce test contiennent des données relatives au comptage de séquences correspondant à la présence éventuelle d'un transcrite de fusion, c'est-à-dire à la ligation de deux sondes et à leur amplification.

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.

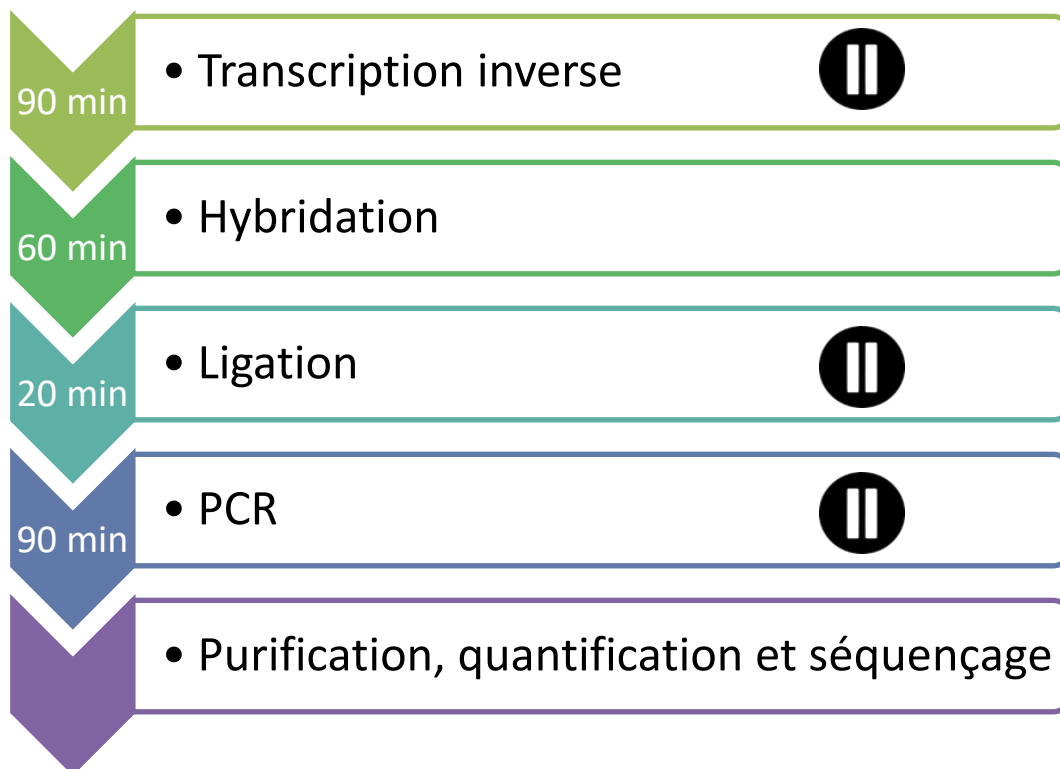
## Principe du test.

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 <b>GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-SFPM
Barcodes <b>GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-BC-xxx
Amorce de séquence <b>GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-SP-001
-----	
Barcodes GAPDH <b>GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-BCC-xxx
Amorce de séquence GAPDH <b>GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-SP-002

XXX : n° de barcode

A réception, ces réactifs doivent être conservés entre -25°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 <b>GEP-SFPM</b>	30 µL	48 µL	54 µL	108 µL
Barcodes <b>GEP-BC-xxx (de 001 à 032 en fonction du nombre d'analyses achetées)</b> 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
	5 µL/BC	9 µL/BC	9 µL/BC	9 µL/BC
Amorces de séquence <b>GEP-SP-001</b>	60 µL	96 µL	144 µL	288 µL
Pour le contrôle interne				
Barcodes GAPDH <b>GEP-BCC-xxx (de 001 à 032 en fonction du nombre d'analyses achetées)</b> 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
	5 µL/BCC	9 µL/BCC	9 µL/BCC	9 µL/BCC
Amorces de séquence GAPDH <b>GEP-SP-002</b>	60 µL	96 µL	144 µL	288 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/  $\mu$ L).



**Il est recommandé de réaliser l'ensemble de la procédure dans des tubes ou des plaques de PCR de 200  $\mu$ L.**

- **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 2,5  $\mu$ L par réaction) :
  - 5X Vilo reaction mix 1  $\mu$ L
  - Eau nucléase free 1  $\mu$ L
  - 10X super script 0,5  $\mu$ L

- Distribuer ce mix dans des tubes PCR de 200  $\mu\text{L}$  (2,5  $\mu\text{L}$  par tube) conservés sur la glace ou sur un portoir réfrigérant.
- Ajouter 2,5  $\mu\text{L}$  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 -25°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  $\mu\text{L}$  par réaction) :
  - Salsa MLPA Buffer 1,5  $\mu\text{L}$
  - Mix de sonde **GENEXPATH SarcomaFusion** 1,5  $\mu\text{L}$
- Vortexer, centrifuger brièvement.
- Ajouter 3  $\mu\text{L}$  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  $\mu$ L par réaction) :
  - Eau nuclease free 25  $\mu$ L
  - Salsa Ligase Buffer A 3  $\mu$ L
  - Salsa Ligase Buffer B 3  $\mu$ L
- Vortexer, centrifuger brièvement
  - Salsa Ligase 65 1  $\mu$ L
- 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  $\mu$ L 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 -25°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 donné, 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 -25°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 -25°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 10<sup>5</sup> 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.**

- Amorces 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  $\mu$ L du pool de librairies **GENEXPATH Sarcoma Fusion** et 3  $\mu$ 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  $\mu$ L de chaque amorce de séquençage **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 et GEP-SP-002, si contrôle interne) dans un volume final de 600  $\mu$ L de tampon HT1, puis déposer ces 600  $\mu$ 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  $\mu$ L), ajouter 3  $\mu$ L de chaque amorce de séquençage

**GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 et GEP-SP-002, si contrôle interne) puis déposer 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  $\mu$ L du pool de librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** et 3  $\mu$ 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  $\mu$ L de chaque amorce de séquençage **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 et GEP-SP002, si contrôle interne) dans un volume final de 2000  $\mu$ L 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  $\mu$ L de chaque amorce de séquençage **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 et GEP-SP-002, si contrôle interne) puis déposer 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 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 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 transcrite de fusion, le nombre de reads et d'UMI obtenus ainsi qu'une référence bibliographique correspondant au transcrite (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 / obtenu	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

<b>Lignée cellulaire 2</b>	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.

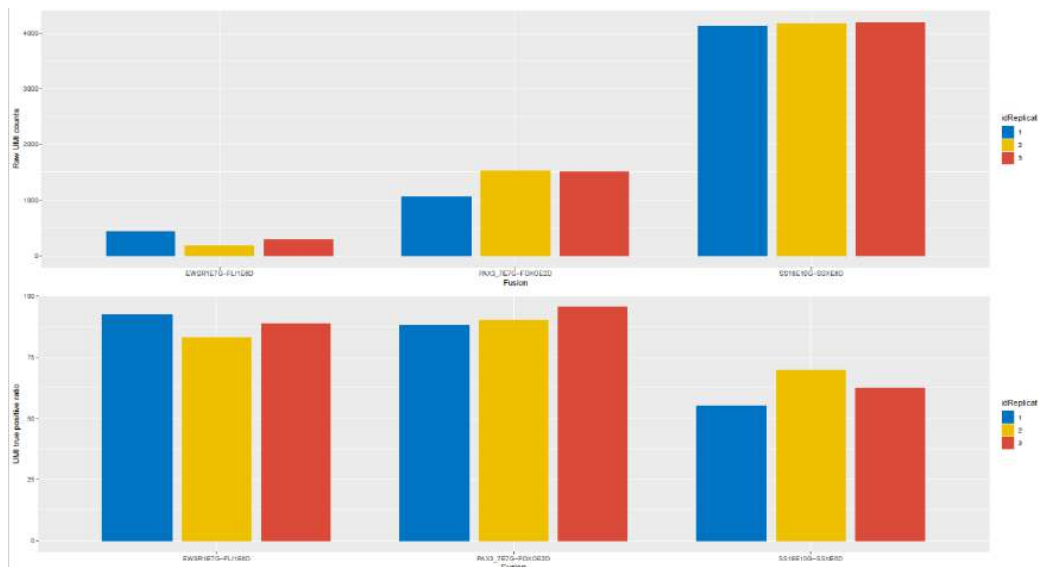


Figure 1 : Les histogrammes représentent en haut le nombre brut d'UMI détectés et en bas celui-ci rapporté au nombre total d'UMI de l'échantillon en fonction de la fusion attendue et des réplicas.

### 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.

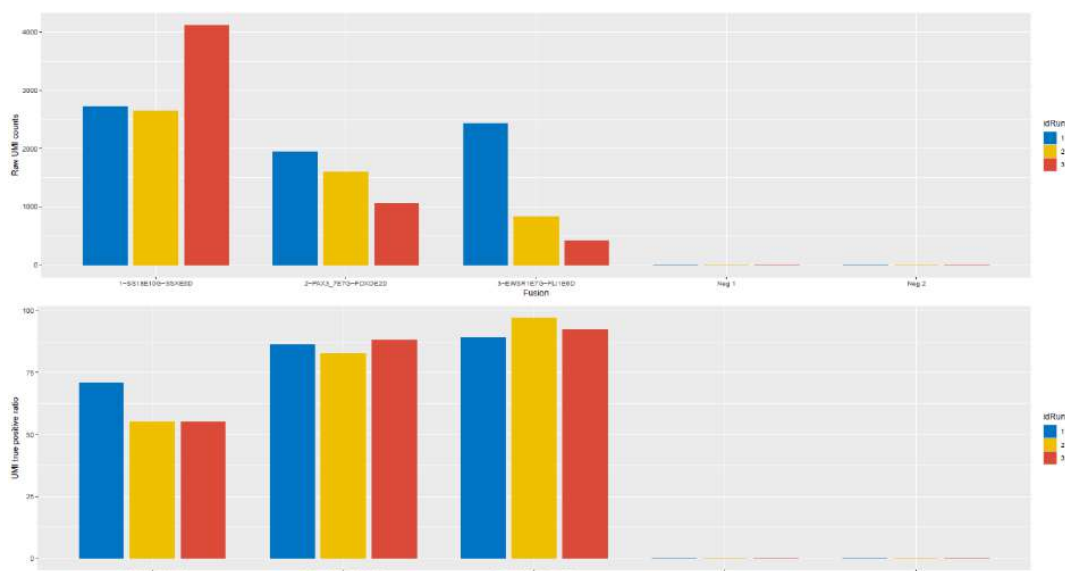


Figure 2 : Les histogrammes représentent en haut le nombre brut d'UMI détectés et en bas celui-ci rapporté au nombre total d'UMI de l'échantillon en fonction de la fusion attendue et du run.

## 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.

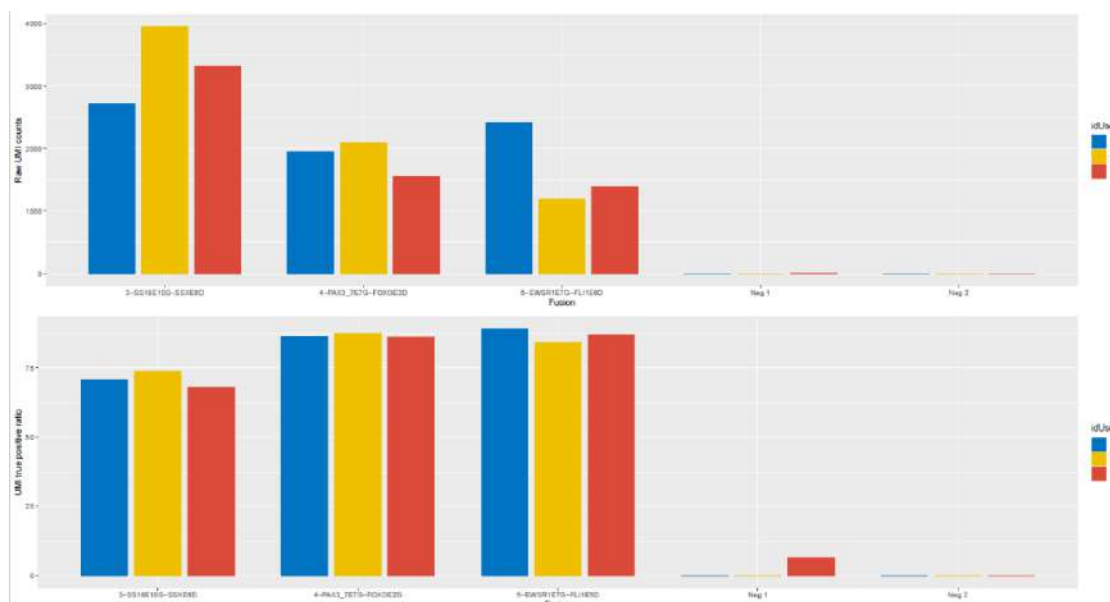


Figure 3 : Les histogrammes représentent en haut le nombre brut d'UMI détectés et en bas celui-ci rapporté au nombre total d'UMI de l'échantillon en fonction de la fusion attendue et de l'utilisateur.

## 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 sériées 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.

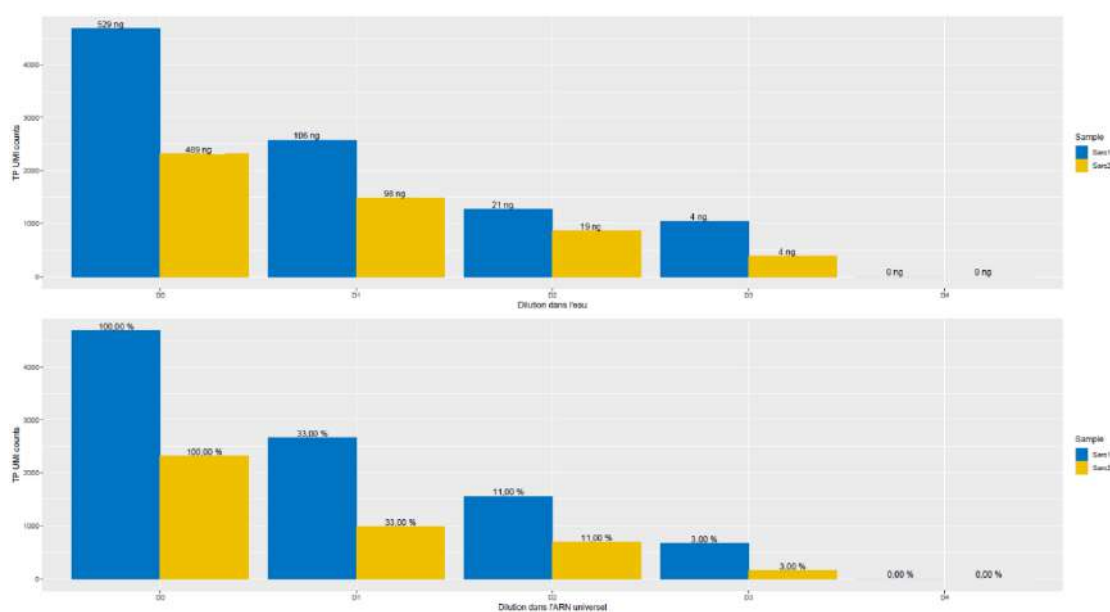











Figure 4 : Les histogrammes représentent le nombre brut d'UMI détectés des fusions attendues dans deux échantillons en fonction des gammes de dilution réalisées dans de l'eau (haut) ou dans de l'ARN universel (bas).

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

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

DEUTSCH.....	49
Wichtige Vorsichtsmaßnahmen. ....	52
Allgemeine Empfehlungen.....	52
Symbole .....	52
Verwendungszweck.....	53
Testprinzip.....	53
Reagenzien.....	54
Inhalt des GENEXPATH SarcomaFusion Reagenzien-Kits. ....	54
Format der vermarkteten Reagenzien-Kits und Mengen:.....	55
Nicht im Reagenzien-Kit enthaltene Reagenzien: .....	55
Benötigte Materialien:.....	56
Bevor Sie beginnen.....	56
Biologische Proben.....	56
Programmierung von Thermocyclern.....	57
Programm 1: Pre-PCR.....	57
Programm 2: PCR. ....	58
Detailliertes Protokoll.....	58
Schritt 1: Reverse Transkription.....	58
Benötigte Reagenzien.....	58
Reverse Transkription. ....	58
Schritt 2: Hybridisierung der Sonden.....	59
Benötigte Reagenzien.....	59
Hybridisierung der Sonden.....	59
Schritt 3: Ligation. ....	59
Benötigte Reagenzien.....	59
Ligation.....	59
Schritt 4: Amplifikation und Integration von Barcodes und Adaptern.....	60
Benötigte Reagenzien.....	61
Amplifikation.....	61
Schritt 5: Aufreinigung und Dosierung von Sequenzierbibliotheken. ....	61
Benötigte Reagenzien.....	62
Schritt 5.a: Aufreinigung der Sequenzierbibliotheken.....	62
Schritt 5.b: Dosierung von Sequenzierbibliotheken. ....	62
Schritt 6: Verdünnung, Poolen und Sequenzierung der Bibliotheken.....	62

Benötigte Reagenzien.....	62
Sequenzierung in einem Illumina MiSeq-Sequenziergerät.....	62
• Schritt 6.a: Verdünnung und Poolen von Bibliotheken.....	63
• Schritt 6.b: Denaturierung und Verdünnung des Bibliothekspools. ....	63
• Schritt 6.c: Vorbereitung der Sequenzierungsprimer. ....	63
• Schritt 6.d: Vorbereitung des Probenblatts. ....	63
• Schritt 6.e: Starten der Sequenzierung. ....	64
Sequenzierung in einem Illumina NextSeq 500/550 System. ....	64
• Schritt 6.a: Verdünnung und Poolen von Bibliotheken.....	64
• Schritt 6.b: Denaturierung und Verdünnung des Bibliothekspools. ....	64
• Schritt 6.c: Vorbereitung der Sequenzierungsprimer. ....	65
• Schritt 6.d: Vorbereitung des Probenblatts. ....	65
• Schritt 6.e: Starten der Sequenzierung. ....	65
Schritt 7: Analyse der Ergebnisse.....	65
Verfahrensgrenzen .....	66
Leistungsbestimmung.....	67
Analytische Leistungen .....	67
Tabelle 1: Zusammenfassung der erwarteten Ergebnisse .....	67
Analytische Leistungen an einer Patientenkohorte.....	68
Wiederholbarkeit .....	68
Wiederholbarkeits-Zwischenläufe .....	69
Reproduzierbarkeit .....	69
Analytische Sensibilität .....	70
Literatur .....	71
Symboltabelle .....	72
Hinweise .....	72

## 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](mailto:contact@genexpath.com).
- Alle schwerwiegenden Vorfälle, die im Zusammenhang mit dem Diagnostikum aufgetreten sind, müssen uns gemeldet werden: [contact@genexpath.com](mailto: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.

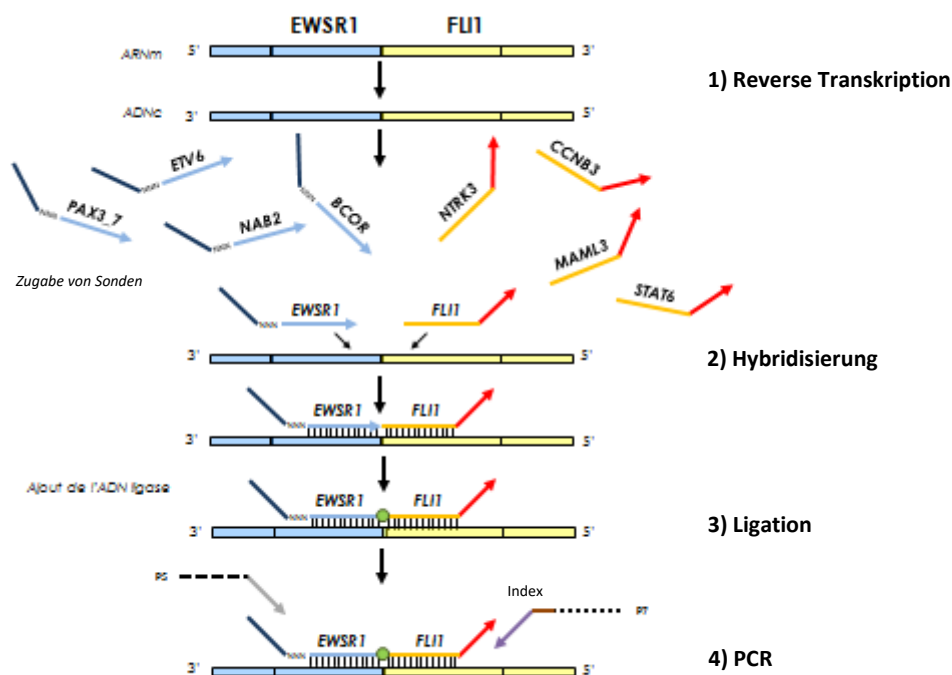
Die mit diesem Test erzeugten fastQ-Dateien enthalten Daten über die Zählung von Sequenzen, die dem möglichen Vorhandensein eines Fusionstranskripts entsprechen, d. h. über die Ligation von zwei Sonden und deren Amplifikation.

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.

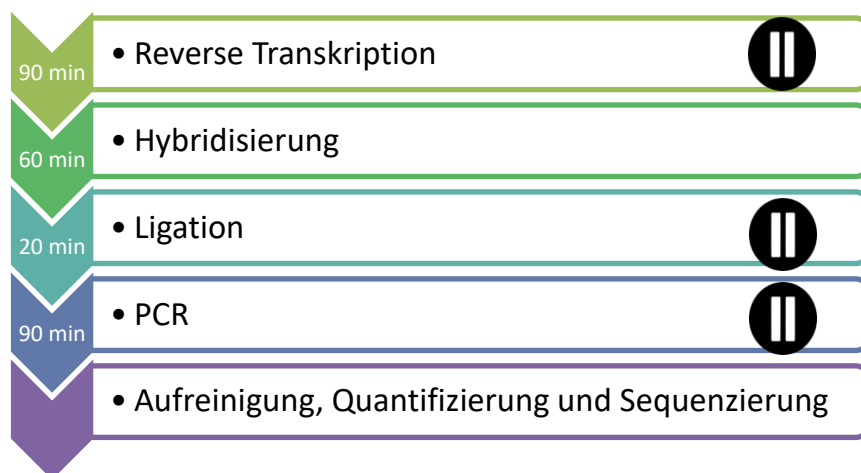
## Testprinzip

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 <b>GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-SFPM
Barcodes <b>GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-BC-xxx
Sequenzprimer <b>GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-SP-001

---

Barcodes GAPDH <b>GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-BCC-xxx
Sequenzprimer GAPDH <b>GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-SP-002

XXX: Barcode-Nr.

Nach Erhalt müssen diese Reagenzien zwischen -25 °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 <b>GEP-SFPM</b>	30 µL	48 µL	54 µL	108 µL
Barcodes <b>GEP-BC-xxx (von 001 bis 032, je nach Anzahl der gekauften Analysen)</b> 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	9 µL/BC	9 µL/BC	9 µL/BC
Sequenzierungsprimer <b>GEP-SP-001</b>	60 µL	96 µL	144 µL	288 µL
Für die interne Kontrolle				
Barcodes GAPDH <b>GEP-BCC-xxx (von 001 bis 032, je nach Anzahl der gekauften Analysen)</b> 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	9 µL/BCC	9 µL/BCC	9 µL/BCC
GAPDH-Sequenzierungsprimer <b>GEP-SP-002</b>	60 µL	96 µL	144 µL	288 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.
<b>SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit</b>	Invitrogen, Art.-Nr. 11754250
<b>SALSA MLPA Buffer</b>	MRC Holland, Art.-Nr. SMR33
<b>SALSA Ligase Buffer A</b>	MRC Holland, Art.-Nr. SMR12
<b>SALSA Ligase Buffer B</b>	MRC Holland, Art.-Nr. SMR13
<b>SALSA Ligase 65</b>	MRC Holland, Art.-Nr. SMR20

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

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

### Benötigte Materialien:

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

## Detalliertes 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 2,5 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 -25 °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 Röhren 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 -25 °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 -25 °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 -25 °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 10<sup>5</sup> 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  $\mu$ L des **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothekspools und 3  $\mu$ 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  $\mu$ L jedes **GENEXPATH SarcomaFusion**-Sequenzierungsprimers (GEP-SP-001 und GEP-SP-002, falls interne Kontrolle) in einem Endvolumen von 600  $\mu$ L HT1-Puffer verdünnen und diese 600  $\mu$ 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  $\mu$ L) pipettieren, 3  $\mu$ L jedes **GENEXPATH SarcomaFusion**-Sequenzierungsprimers (GEP-SP-001 und GEP-SP-002, falls interne Kontrolle) zugeben und diesen Mix dann 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  $\mu$ L des **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothekspools und 3  $\mu$ L 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 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	Erwartetes Ergebnis / entnommen	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	Negativ <i>Keine Fusion festgestellt</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	Negativ <i>Keine Fusion festgestellt</i>	Falsch-negativ (FN)	0
Zellreihe 2	Negativ <i>Keine Fusion festgestellt</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 Detektion von Fusionstranskripten 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

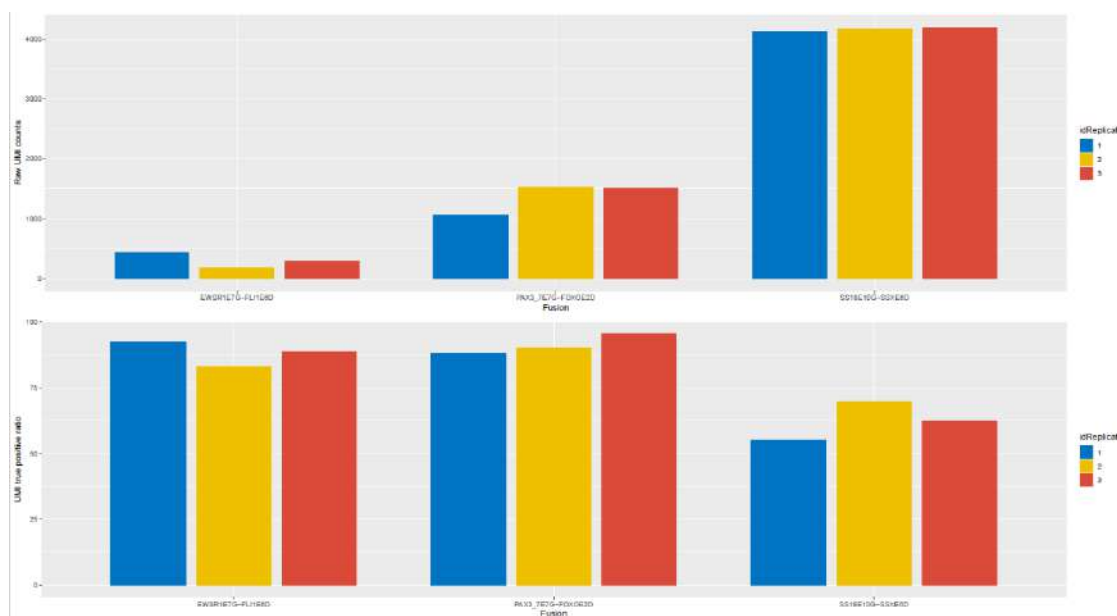


Abbildung 1: Die Histogramme stellen oben die rohe Anzahl der erkannten UMIs und unten die rohe Anzahl der UMIs dar, die sich auf die Gesamtzahl der UMIs der Stichprobe gemäß der erwarteten Fusion und den Replikaten beziehen.

- **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.

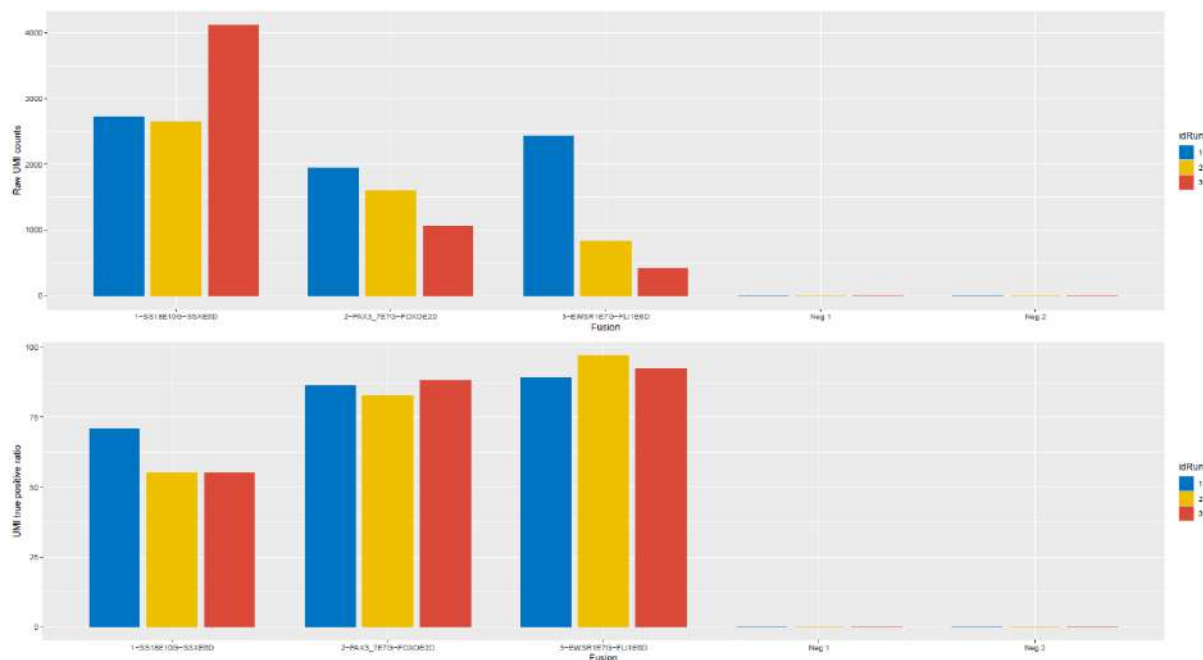


Abbildung 2: Die Histogramme stellen oben die Rohzahl der detektierten UMI und unten die Rohzahl der UMI bezogen auf die Gesamtzahl der UMI der Stichprobe entsprechend der erwarteten Fusion und des Laufs dar.

## 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 Exon6, 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.

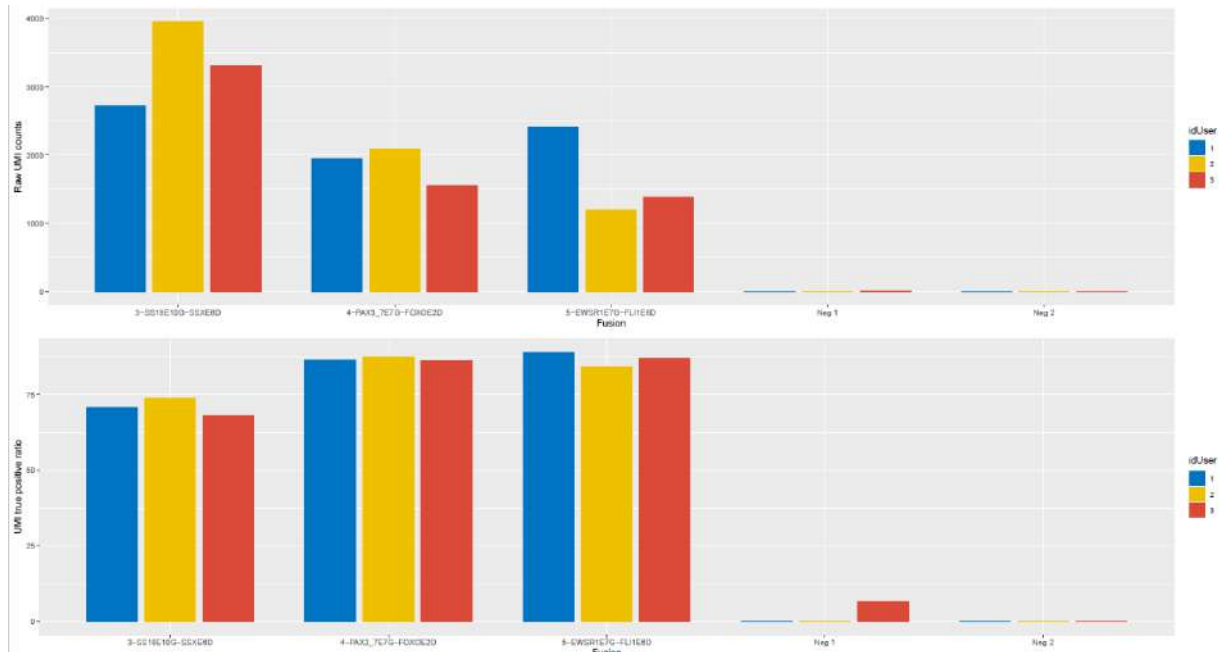


Abbildung 3: Die Histogramme stellen oben die Rohzahl der erkannten UMI und unten die Rohzahl der UMI bezogen auf die Gesamtzahl der UMI der Stichprobe entsprechend der erwarteten Fusion und des Benutzers dar.

### 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.

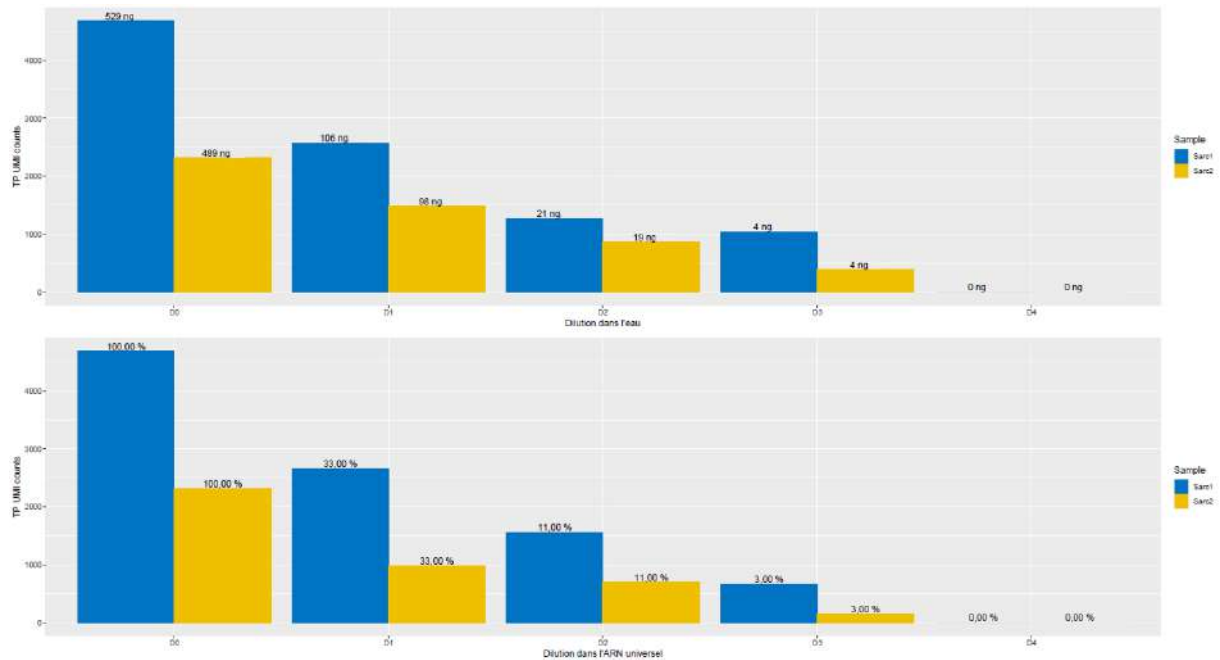











Abbildung 4: Die Histogramme stellen die rohe Anzahl der UMIs dar, die aus den erwarteten Fusionen in zwei Proben gemäß den Verdünnungsbereichen in Wasser (oben) oder in universeller RNA (unten) nachgewiesen wurden.

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

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



ESPAÑOL.....	73
Precauciones importantes.....	76
Recomendaciones generales.....	76
Pictogramas.....	76
Uso previsto.....	77
Principio de la prueba.....	77
Reactivos.....	79
Contenido del kit de reactivos GENEXPATH SarcomaFusion.....	79
Formato de los kits de reactivos comercializados y cantidades:.....	79
Reactivos no suministrados en el kit de reactivos:.....	80
Material necesario:.....	80
Antes de empezar.....	81
Muestras biológicas.....	81
Programación de los termocicladores.....	81
Programa 1:post-PCR.....	81
Programa 2: PCR.....	82
Protocolo detallado.....	82
Etapa 1: Transcripción inversa.....	82
Reactivos necesarios.....	82
Transcripción inversa.....	82
Etapa 2: Hibridación de las sondas.....	83
Reactivos necesarios.....	83
Hibridación de las sondas.....	83
Etapa 3: Ligación.....	84
Reactivos necesarios.....	84
Ligación.....	84
Etapa 4: Amplificación e incorporación de códigos de barras y adaptadores.....	85
Reactivos necesarios.....	85
Amplificación.....	85
Etapa 5: Purificación y análisis de las bibliotecas de secuenciación.....	86
Reactivos necesarios.....	86
Etapa 5.a: Purificación de las bibliotecas de secuenciación.....	86
Etapa 5.b: Análisis de las bibliotecas de secuenciación.....	86
Etapa 6: Dilución, pool y secuenciación de las bibliotecas.....	86



Reactivos necesarios. ....	87
Secuenciación en un secuenciador Illumina MiSeq. ....	87
Secuenciación en una plataforma Illumina NextSeq 500/550. ....	88
Etapas 7: Análisis de los resultados. ....	90
Limitaciones del procedimiento ....	90
Caracterización de las prestaciones ....	91
Prestaciones analíticas. ....	91
Tabla 1: Resumen de los resultados previstos ....	91
Rendimiento analítico en una cohorte de pacientes. ....	92
Repetibilidad ....	92
Repetibilidad intra-run. ....	92
Repetibilidad intra-run. ....	93
Bibliografía. ....	95
Tabla de símbolos ....	96
Notas. ....	96

## 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](mailto: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](mailto: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.

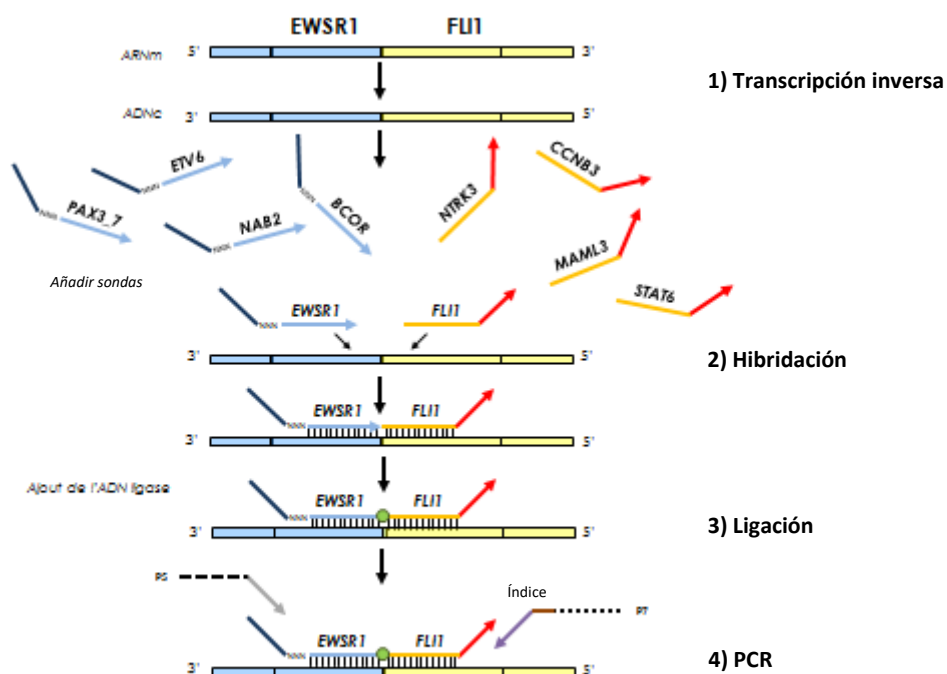
Los archivos fastQ generados mediante esta prueba contienen datos de recuento de secuencias correspondientes a la posible presencia de un transcrito de fusión; es decir, la ligación de dos sondas y su amplificación.

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.

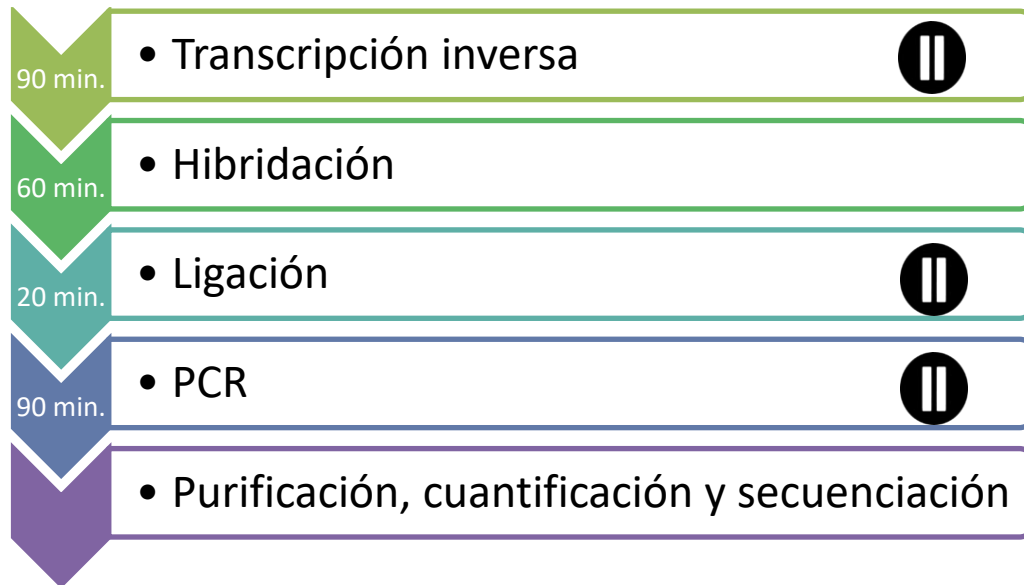
## Principio de la prueba.

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 <b>GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-SFPM
Códigos de barras <b>GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-BC-xxx
Cebador de secuencia <b>GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-SP-001

Códigos de barras GAPDH <b>GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-BCC-xxx
Cebador de secuencia GAPDH <b>GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-SP-002

XXX: número de código de barras

Una vez recibidos, estos reactivos deben conservarse a una temperatura entre -25 °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 <b>GEP-SFPM</b>	30 µL	48 µL	54 µL	108 µL
Códigos de barras <b>GEP-BC-xxx (de 001 a 032 según el número de análisis adquiridos)</b> 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 µL/BC	9 µL/BC	9 µL/BC	9 µL/BC
Cebadores de secuencia <b>GEP-SP-001</b>	60 µL	96 µL	144 µL	288 µL
Para el control interno				
Códigos de barras GAPDH <b>GEP-BCC-xxx (de 001 a 032 según el número de análisis adquiridos)</b> 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 µL/BCC	9 µL/BCC	9 µL/BCC	9 µL/BCC
Cebadores de secuencia GAPDH <b>GEP-SP-002</b>	60 µL	96 µL	144 µL	288 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

**Etapa 2: Hibridación de las sondas.**

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

**Etapa 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 2,5 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 -25 °C y -15 °C.**

## **Etapa 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, centrifúgelos 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  $\mu$ L por reacción) :
  - Nuclease free agua 25  $\mu$ L
  - Salsa Ligase Buffer A 3  $\mu$ L
  - Salsa Ligase Buffer B 3  $\mu$ L
- Agite en el vórtex y centrifugue brevemente
  - Salsa Ligase 65 1  $\mu$ L
- 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  $\mu$ L 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 -25 °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 BEP-BC-xxx para cada una de las muestras analizadas, pero para una misma muestra utilice el mismo número para BEP-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 -25 °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).**

## Etapa 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.

- **Etapa 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 -25 °C y -15 °C antes de la secuenciación.

- **Etapa 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.

## Etapa 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 10<sup>5</sup> 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  $\mu$ L del pool de bibliotecas **GENEXPATH Sarcoma Fusion** y 3  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L de tampón HT1 y, a continuación, coloque estos 600  $\mu$ 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 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 10<sup>5</sup> 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  $\mu$ L del pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** y 3  $\mu$ 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 NextSeq de Illumina hasta una concentración de carga final de 0,8 pM a 1 pM.

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

- Si el pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** se está secuenciando solo, diluya 6  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L de cada cebador de secuenciación **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 y GEP-SP-002, si es un control interno) y dispensar esta mezcla en el pocillo 7 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 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**.

- **Etapa 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 1.

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 / Obtenida	Valores predictivos	
<b>Muestra 1</b>	EWSR1 exón 7 - CREB1 exón 7 EWSR1 exón 7 - CREB1 exón 7	Verdadero positivo (VP)	6
<b>Muestra 2</b>	JAZF1 exón 3 - SUZ12 exón 2 JAZF1 exón 3 - SUZ12 exón 2	Verdadero negativo (VN)	3
<b>Muestra 3</b>	PAX3_7 exón 7 - FOXO exón 2 PAX3_7 exón 7 - FOXO exón 2	Valor predictivo positivo (%)	100 %
<b>Muestra 4</b>	Negativo No se ha detectado ningún fusión	Exhaustividad (%)	100 %
<b>Muestra 5</b>	SS18 exón 10 - SSX exón 6 SS18 exón 10 - SSX exón 6	Tasa de falsos positivos (%)	0 %
<b>Muestra 6</b>	PAX3_7 exón 7 - FOXO exón 2 PAX3_7 exón 7 - FOXO exón 2	Sensibilidad (%)	100 %
<b>Muestra 7</b>	EWSR1 exón 7 - FLI1 exón 6 EWSR1 exón 7 - FLI1 exón 6	Falso positivo (FP)	0
<b>Línea celular 1</b>	Negativo	Falso negativo (FN)	0

	No se ha detectado ningún fusión		
<b>Línea celular 2</b>	Negativo No se ha detectado ningún fusión	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.

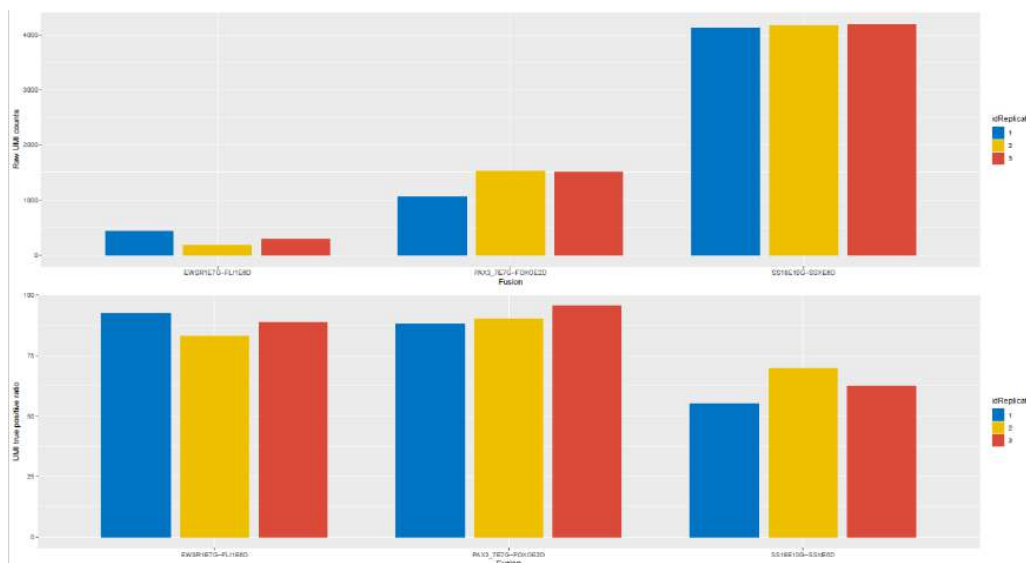


Figura 1: Los histogramas representan en la parte superior el número bruto de UMI detectados y en la parte inferior en relación con el número total de UMI en la muestra en función de la fusión esperada y las réplicas.

## 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.

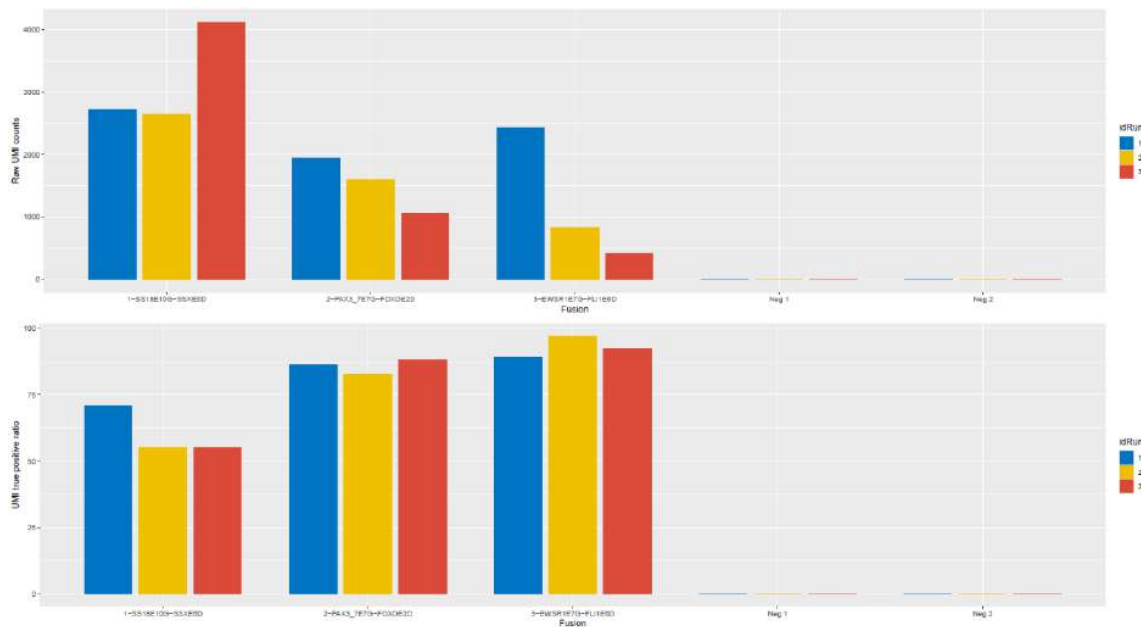


Figura 2: Los histogramas representan en la parte superior el número bruto de UMI detectados y en la parte inferior en relación con el número total de UMI en la muestra de acuerdo con la fusión y ejecución esperadas.

## 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.

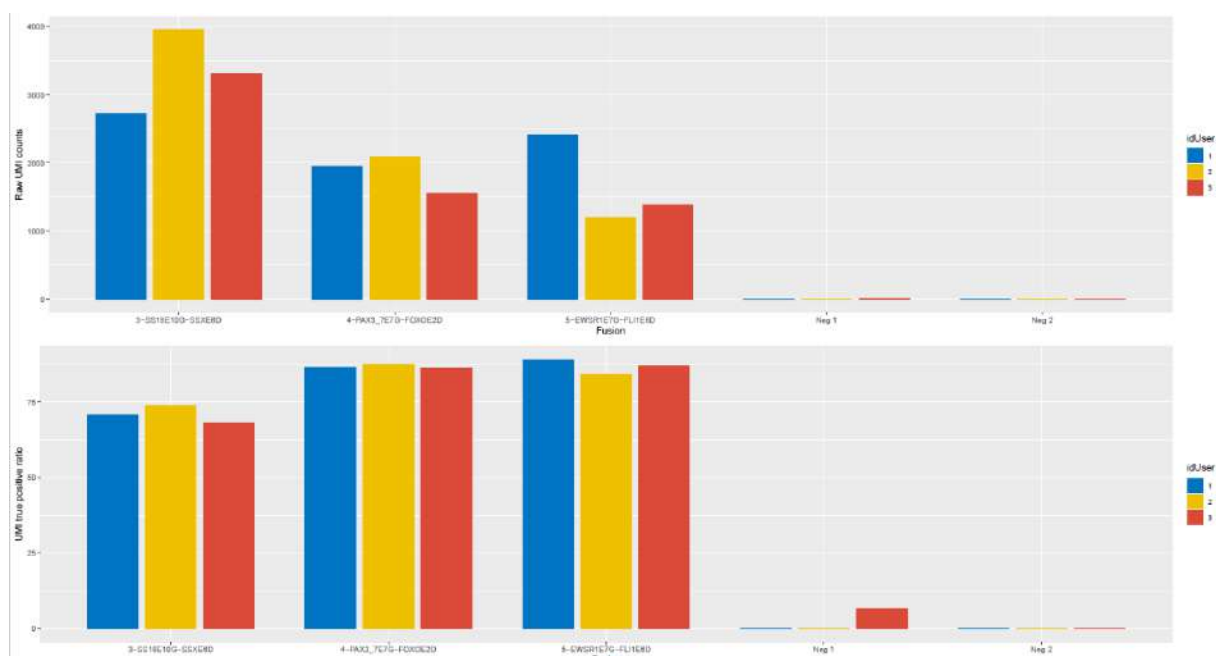


Figura 3: Los histogramas representan en la parte superior el número bruto de UMI detectada y en la parte inferior en relación con el número total de UMI en la muestra según la fusión esperada y el usuario.

## 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.

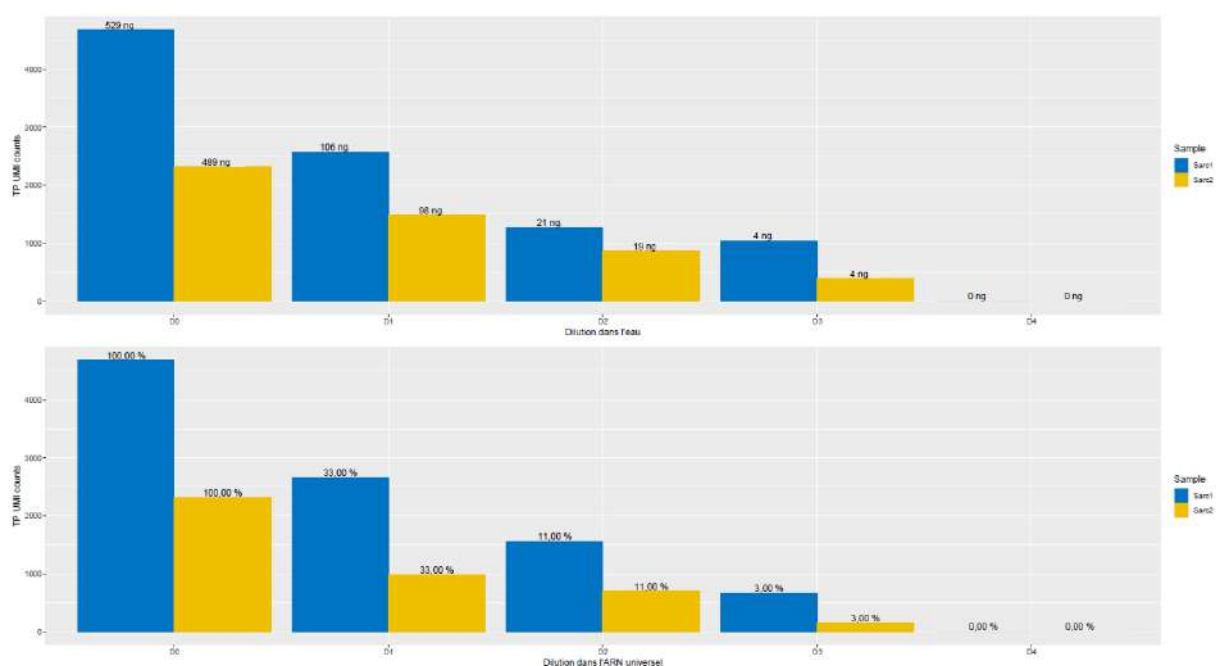











Figura 4: Los histogramas representan el número bruto de UMI detectados de fusiones esperadas en dos muestras basadas en rangos de dilución en agua (arriba) o ARN universal (abajo).

## 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	 Mercado 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.





**ITALIANO**

## **Istruzioni per l'uso GENEXPATH SarcomaFusion.**

**Precauzioni per l'uso.**



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

**Per uso diagnostico *in vitro***

**È riservato all'uso professionale.**

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

**Contatti :**

**Produttore:** GENEXPATH

+33 (0)2.78.08.98.69

113 Avenue des Martyrs de la Résistance

76100 Rouen - Francia

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

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



ITALIANO .....	97
Precauzioni importanti. ....	100
Raccomandazioni generali . ....	100
Pittogrammi.....	100
Destinazione d'uso.....	101
Principio del test. ....	101
Reagenti.....	103
Contenuto del kit di reagenti GENEXPATH SarcomaFusion.....	103
Formato dei kit di reagenti commercializzati e quantità:.....	103
Reagenti non inclusi nel kit di reagenti:.....	104
Materiali richiesti:.....	104
Prima di iniziare. ....	105
Campioni biologici.....	105
Programmazione di termociclatori. ....	105
Programma 1: Pre PCR. ....	105
Programma 2 : PCR.....	106
Protocollo dettagliato.....	106
Passo 1: Trascrizione inversa. ....	106
Reagenti richiesti.....	106
Trascrizione inversa.....	106
Fase 2: Ibridazione delle sonde.....	107
Reagenti richiesti.....	107
Ibridazione di sonde. ....	107
Etape 3 : Legatura. ....	108
Reagenti richiesti.....	108
Legatura.....	108
Fase 4: Amplificazione e incorporazione di codici a barre e adattatori. ....	109
Reagenti richiesti.....	109
Amplificazione.....	109
Fase 5: Purificazione e dosaggio delle librerie di sequenziamento. ....	110
Reagenti richiesti.....	110
Passo 5.a: Purificazione delle librerie di sequenziamento.....	110
Passo 5.b: Determinazione delle librerie di sequenziamento. ....	110
Fase 6: Diluizione, pooling e sequenziamento delle librerie. ....	110
Reagenti richiesti.....	111

Sequenziamento su un sequenziatore Illumina MiSeq.....	111
• Passo 6.a: Diluizione e pool di librerie. ....	111
• Passo 6.b: Denaturazione e diluizione del pool di librerie.....	111
• Fase 6.c: Preparazione degli starter di sequenziamento. ....	111
• Fase 6.d: Preparazione del foglio di iniezione.....	112
• Passo 6.e: Inizia il sequenziamento.....	112
Sequenziamento su una piattaforma NextSeq 500/550 Illumina.....	112
• Passo 6.a: Diluizione e pool di librerie. ....	112
• Passo 6.b: Denaturazione e diluizione del pool di librerie.....	113
• Passo 6.c: Preparazione dei primer di sequenziamento. ....	113
• Fase 6.d: Preparazione del foglio di iniezione.....	113
• Passo 6.e: Inizia il sequenziamento.....	113
Fase 7: Analisi dei risultati. ....	114
Limitazioni della procedura .....	114
Caratterizzazione delle prestazioni .....	115
Prestazioni analitiche su campioni di riferimento .....	115
Tabella 1: Sintesi dei risultati .....	115
Prestazioni analitiche su una coorte di pazienti .....	116
Ripetibilità.....	116
<i>Ripetibilità intra-run</i> .....	116
<i>Ripetibilità inter-runs</i> .....	117
Riproducibilità.....	118
Sensibilità analitica .....	118
Bibliografia.....	119
Tabella dei simboli .....	120
Note .....	120

## Precauzioni importanti.

### Raccomandazioni generali .

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

## Pittogrammi



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



Passaggi in cui il protocollo può essere sospeso.

## Destinazione d'uso

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

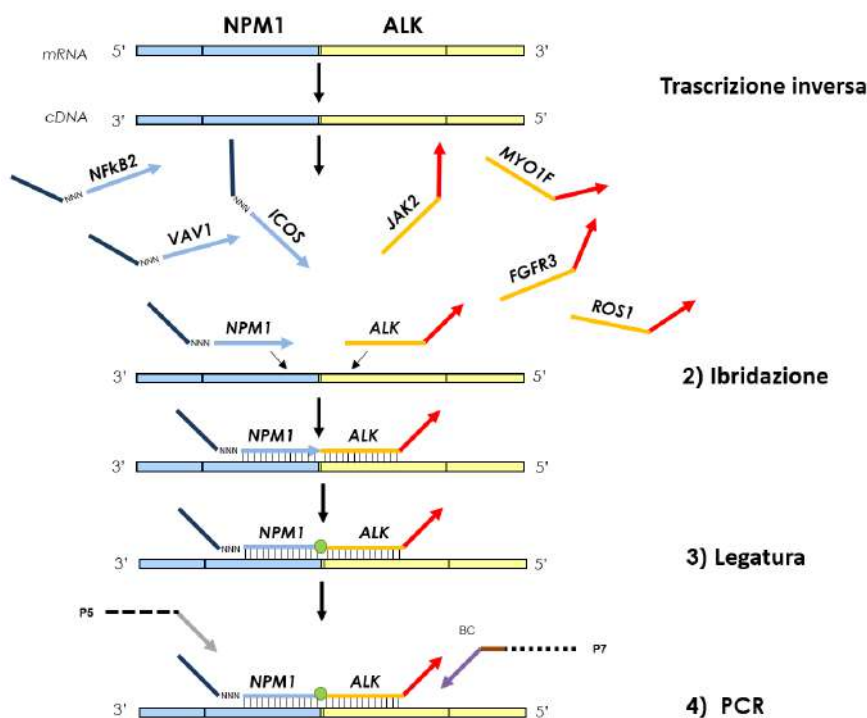
I file fastQ generati utilizzando questo test contengono dati relativi al conteggio delle sequenze corrispondenti all'eventuale presenza di un trascritto di fusione, cioè la legatura di due sonde e la loro amplificazione.

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

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

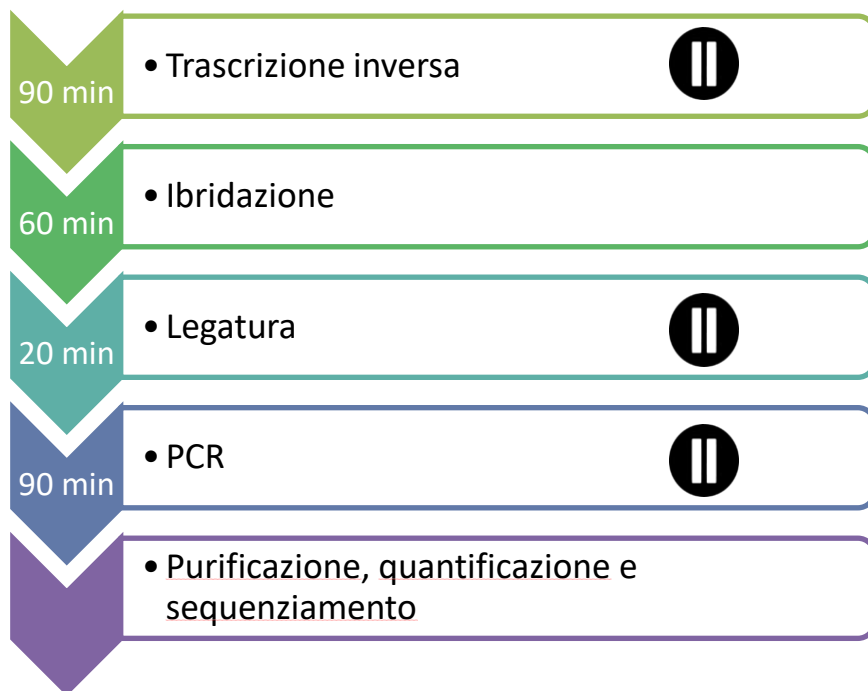
## Principio del test.

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



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

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



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

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

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

## Reagenti.

### Contenuto del kit di reagenti GENEXPATH SarcomaFusion.

<b>GENEXPATH Sarcoma Probe Mix</b>	GEP-SFPM
Codici a barre <b>GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-BC-xxx
Avvio della sequenza <b>GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-SP-001
-----	
Codici a barre GAPDH <b>GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-BCC-xxx
Avvio della sequenza <b>GAPDH GENEXPATH SarcomaFusion</b>	GEP-SP-002

XXX : n° il codice a barre

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

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

La durata di conservazione dei reagenti è di 1 anno.

Tornare alle condizioni di conservazione immediatamente dopo l'uso.

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

### Formato dei kit di reagenti commercializzati e quantità:

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

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

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

## Reagenti non inclusi nel kit di reagenti:

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

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

## Materiali richiesti:

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



## Prima di iniziare.

### Campioni biologici.

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

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

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

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

### Programmazione di termociclatori.

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

Sono necessari due programmi:

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

- **Programma 1: Pre PCR.**



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

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

#### **Fase 1: Trascrizione inversa dell'RNA in cDNA.**

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

**Fase 2: Ibridazione delle sonde.**

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

**Fase 3 : Legatura.**

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

- **Programma 2 : PCR.**

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

## Protocollo dettagliato.

### Passo 1: Trascrizione inversa.

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

- **Reagenti richiesti.**

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



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

- **Trascrizione inversa.**

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

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



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

## Fase 2: Ibridazione delle sonde.

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

- **Reagenti richiesti.**

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

- **Ibridazione di sonde.**

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

### Etape 3 : Legatura.

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

- **Reagenti richiesti.**

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

- **Legatura.**

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



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



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

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

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

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

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

- **Reagenti richiesti.**

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

- **Amplificazione.**

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



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

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



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



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

## Fase 5: Purificazione e dosaggio delle librerie di sequenziamento.

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

- **Reagenti richiesti.**

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

- **Passo 5.a: Purificazione delle librerie di sequenziamento.**



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

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



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

- **Passo 5.b: Determinazione delle librerie di sequenziamento.**

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

## Fase 6: Diluizione, pooling e sequenziamento delle librerie.

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



**Per risultati ottimali, è necessario leggere un minimo di<sup>10-5</sup> sequenze per ogni campione.**

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



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

- **Reagenti richiesti.**

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

- **Sequenziamento su un sequenziatore Illumina MiSeq.**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

- **Sequenziamento su una piattaforma NextSeq 500/550 Illumina.**

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

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

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

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



concentrazione e che richiedono 3 sequenze M, mescolare 1  $\mu\text{L}$  del pool di librerie **GENEXPATH SarcomaFusion** e 3  $\mu\text{L}$  del pool di librerie B.

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

## Fase 7: Analisi dei risultati.

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Limitazioni della procedura

- Il test SarcomaFusion è stato sviluppato a partire dai dati della letteratura per rilevare le trascrizioni di fusione più comuni nei pazienti con sarcoma. È destinato all'uso su FFPE o campioni congelati, possibilmente ottenuti da biopsie con ago.

- Le prestazioni dimostrate nel paragrafo "Caratterizzazione delle prestazioni" sono state validate secondo le istruzioni sopra descritte.

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

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

## Caratterizzazione delle prestazioni

### Prestazioni analitiche su campioni di riferimento

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

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

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

#### • Tabella 1: Sintesi dei risultati

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

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

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

### **Prestazioni analitiche su una coorte di pazienti**

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

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

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

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

### **Ripetibilità**

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

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

### ***Ripetibilità intra-run***

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

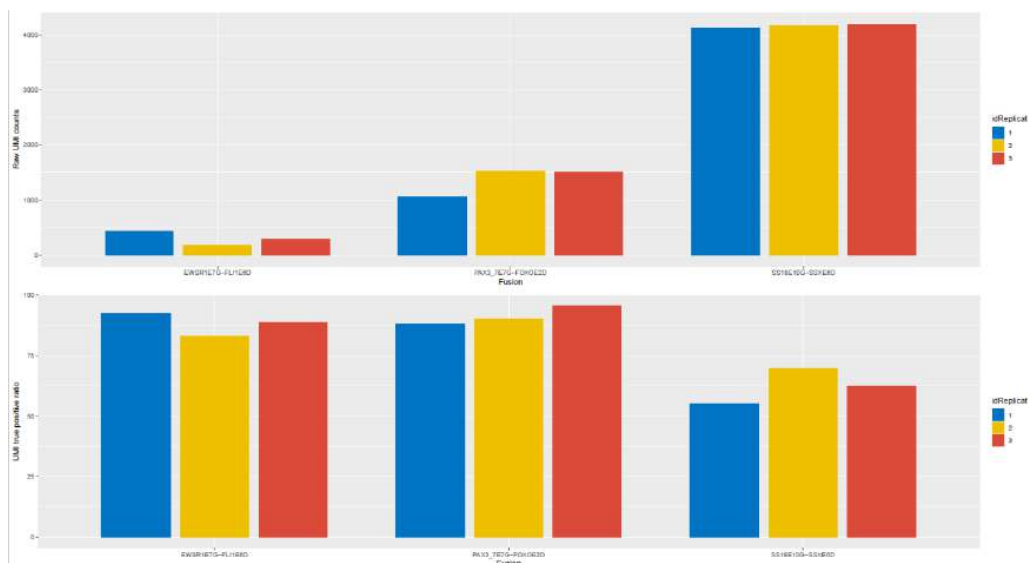


Figura 1 : Gli istogrammi rappresentano in alto il numero grezzo di UMI rilevato e in basso il numero totale di UMI nel campione in base alla fusione e alle repliche attese.

### Ripetibilità inter-runs

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

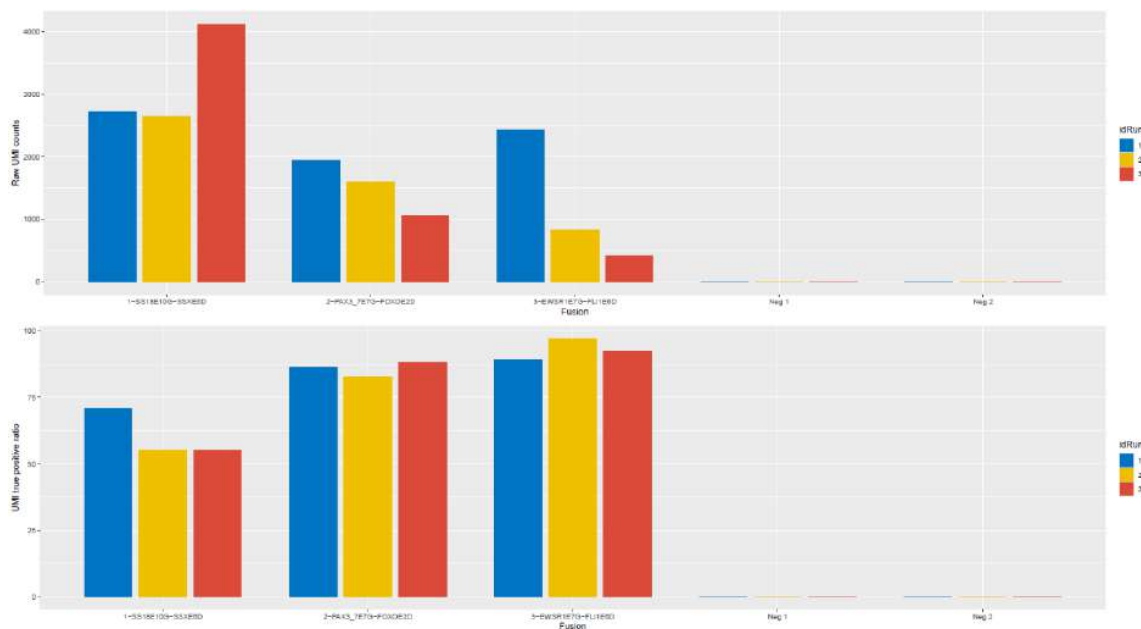


Figura 2: Gli istogrammi rappresentano in alto il numero grezzo di UMI rilevati e in basso il numero totale di UMI nel campione in base alla fusione e corsa prevista.

## Riproducibilità

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

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

- 3 campioni positivi (SS18 esone 10 – SSX esone6, PAX3\_7 esone 7 – FOXO esone 2, EWSR1 esone 7 – FLI1 esone 6)
- 2 campioni negativi (linee cellulari)

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

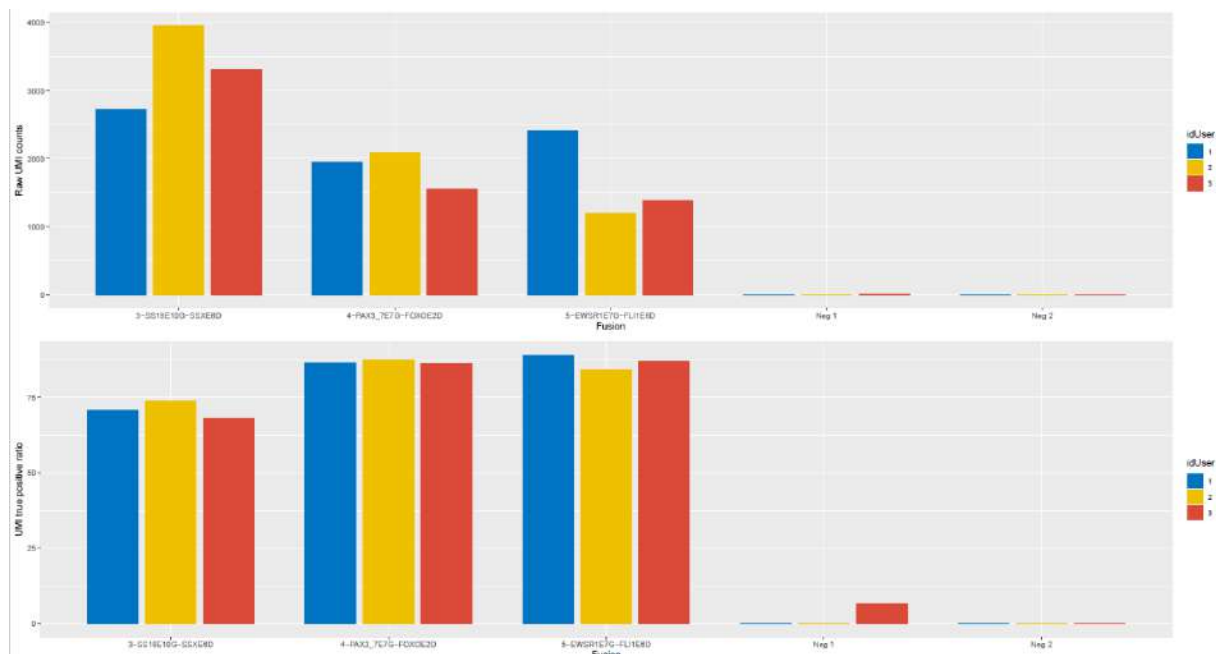


Figura 3: Gli istogrammi rappresentano in alto il numero grezzo di UMI rilevato e in basso il numero totale di UMI nel campione in base alla fusione attesa e all'utente.

## Sensibilità analitica

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

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

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

I risultati sono illustrati nella Figura 4.

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

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

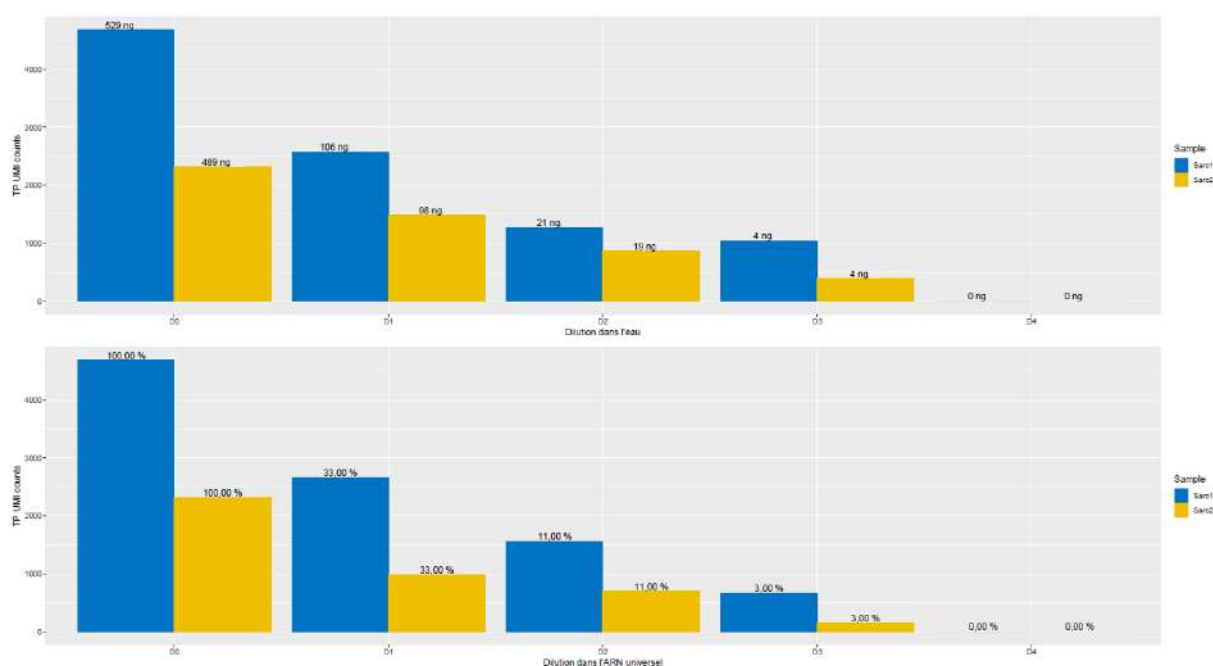











Figura 4: Gli istogrammi rappresentano il numero grezzo di UMI rilevate di fusioni attese in due campioni basati su intervalli di diluizione in acqua (in alto) o RNA universale (in basso).

## Bibliografia

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

## Tabella dei simboli

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

## Note

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

Le informazioni contenute nel presente documento sono soggette a modifiche.





**PORTUGUÊS**

## **GUIADO UTILIZADOR GENEXPATH SarcomaFusion**

**Precauções para o utilizador.**

**CE** Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* de acordo com a Diretiva (UE)  
98/79/EC  
**IVD** Para uso em diagnóstico *in vitro*

**É destinado apenas a uso profissional.  
Leia todas as informações deste guia do utilizador antes de usar.**

**Contactos:**

**Fabricante:** GENEXPATH

+33 (0)2.78.08.98.69

113 avenue des Martyrs de la Résistance

76100 Rouen - França

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

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



PORTUGUÊS.....	121
Precauções importantes.....	124
Recomendações gerais.....	124
Ícones.....	124
Uso pretendido.....	125
Princípio do teste.....	125
Reagentes.....	126
Conteúdo do reagente GENEXPATH SarcomaFusion kit.....	126
Formato dos kits de reagentes vendidos e quantidades:.....	127
Reagentes não fornecidos no kit de reagentes :.....	128
Necessário equipamento:.....	128
Antes de começar.....	129
Amostras biológicas.....	129
Programação dos termocicladores.....	129
• Programa 1: Pré- PCR.....	129
• Programa 2: PCR.....	130
Protocolo pormenorizado.....	130
Passo 1: Transcrição reversa.....	130
• Reagentes necessários.....	130
• Transcrição reversa.....	130
Passo 2: Hibridação das sondas.....	131
• Reagentes necessários.....	131
• Hibridação de sondas.....	131
Passo 3: Ligation.....	132
• Reagentes necessários.....	132
• Ligação.....	132
Passo 4: Amplificação e incorporação de códigos de barras e adaptadores.....	133
• Reagentes necessários.....	133
• Amplificação.....	133
Passo 5: Purificação e ensaio de sequenciação de bibliotecas.....	134
• Reagentes necessários.....	134
• Passo 5.a: Purificação das bibliotecas de sequenciação.....	134
• Passo 5.b: Ensaio de sequenciação das bibliotecas.....	134

Passo 6: Diluição, junção (pooling) e sequenciação das bibliotecas . . . . .	134
• Reagentes necessários. . . . .	135
• Sequenciação num sequenciador Illumina MiSeq . . . . .	135
• Passo 6.a: Diluição e junção (pooling) das bibliotecas . . . . .	135
• Passo 6.b: Desnaturação e diluição do pool das bibliotecas. . . . .	135
• Passo 6.c: Preparação dos primers de sequenciação. . . . .	135
• Passo 6.d: Preparação da folha de injeção . . . . .	136
• Passo 6.e: Início da sequenciação . . . . .	136
• Sequenciação numa plataforma Illumina NextSeq 500/550 . . . . .	136
• Passo 6.a: Diluição e junção (pooling) das bibliotecas . . . . .	136
• Passo 6.b: Desnaturação e diluição do pool das bibliotecas. . . . .	137
• Passo 6.c: Preparação dos primers da sequenciação. . . . .	137
• Passo 6.d: Preparação da folha de injeção . . . . .	137
• Passo 6.e: Início da sequenciação . . . . .	138
Passo 7: Análise de Resultados. . . . .	138
Limites do procedimento. . . . .	139
Caracterização dos desempenhos . . . . .	139
Desempenho analítico em amostras de referência. . . . .	139
• Quadro 1: Resumo dos resultados do sítio. . . . .	139
Desempenhos analíticos numa coorte de pacientes . . . . .	140
Repetibilidade . . . . .	141
Repetibilidade intra- corrida . . . . .	141
Repetibilidade entre corridas . . . . .	141
Reprodutibilidade . . . . .	142
Analítico sensibilidade . . . . .	143
Bibliografia. . . . .	144
Tabela de symbols. . . . .	144
Notas. . . . .	145

## Precauções importantes.

### Recomendações gerais.

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

## Ícones



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



Etapas em que o protocolo pode ser suspenso.

## Uso pretendido

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

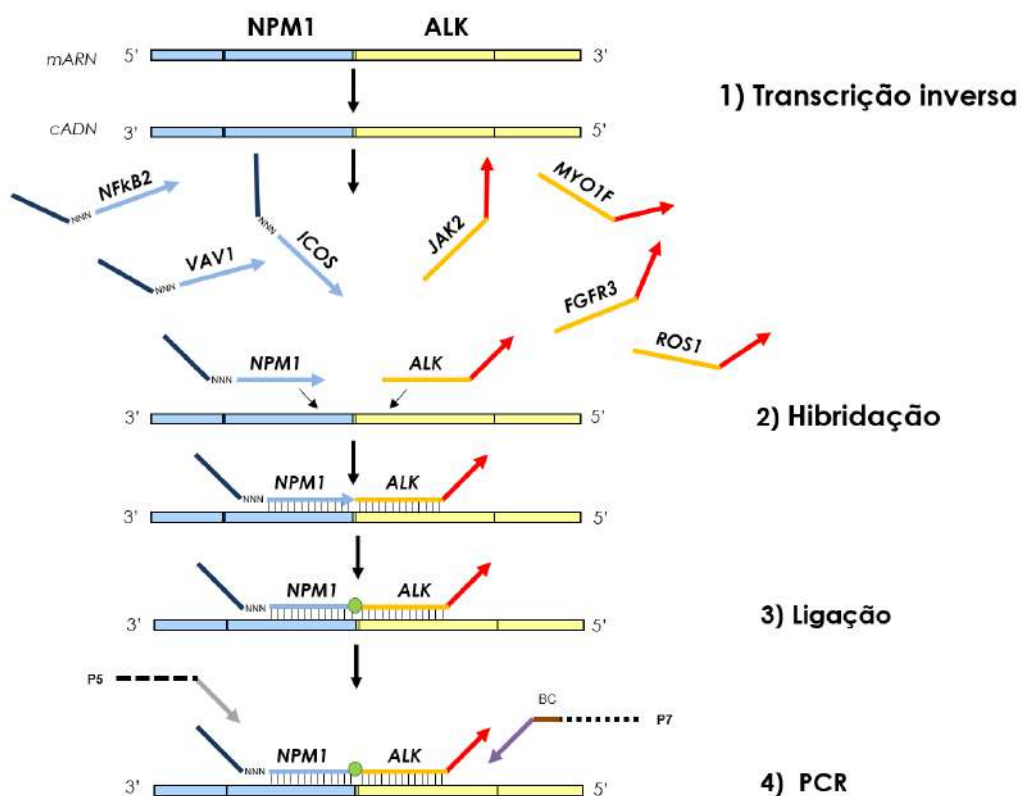
Os ficheiros fastQ gerados com este teste contêm dados sobre a contagem de sequências correspondentes à presença potencial de um transcrito de fusão, ou seja, a ligação de duas sondas e a sua amplificação.

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

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

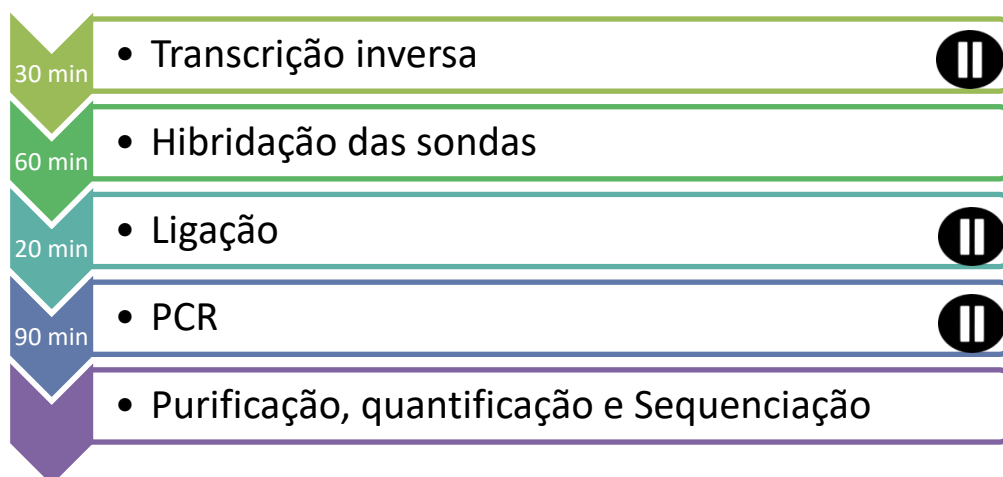
## Princípio do teste

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



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

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



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

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

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

## Reagentes.

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

<b>GENEXPATH SarcomaFusion</b> Mistura de sondas	GEP-SFPM
<b>GENEXPATH SarcomaFusion</b> Códigos de barras	GEP-BC-xxx
<b>GENEXPATH SarcomaFusion</b> Primer de sequenciação	GEP-SP-001
<hr/>	
<b>GENEXPATH SarcomaFusion</b> códigos de barras GAPDH	GEP-BCC-xxx
<b>GENEXPATH SarcomaFusion</b> Primer de sequenciação GAPDH	GEP-SP-002

XXX: número de código de barras

Após a receção, estes reagentes devem ser armazenados entre -25°C e -15°C. Estão prontos a utilizar e não necessitam de ser diluídos.

O prazo de validade dos reagentes é de 1 ano.

Devolver às condições de armazenamento imediatamente após a utilização. Não utilizar os reagentes após o prazo de validade indicado no rótulo.

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

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

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

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

### Reagentes não fornecidos no kit de reagentes :

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

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

### Necessário equipamento:

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



## Antes de começar.

### Amostras biológicas

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

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

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

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

### Programação dos termocicladores

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

São necessários dois programas:

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

- **Programa 1: Pré-PCR.**



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

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

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

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

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

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

### **Etapa 3: Ligação.**

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

- **Programa 2: PCR.**

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

## **Protocolo pormenorizado.**

### **Passo 1: Transcrição reversa .**

Este passo deve ser efectuado zona pré-PCR.

- **Reagentes necessários.**

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



*Recomenda-se a realização de todo o procedimento em placas ou tubos PCR de 200  $\mu$ L.*

- **Transcrição reversa .**

- Descongelar os seguintes reagentes e mantê-los em gelo ou numa

grelha de arrefecimento: Mistura de reação Vilo 5X e super script 10X.

- Preparar uma mistura de transcrição reversa. Para cada amostra, misturar (para um volume total de 2,5 µL por reação):
  - Mistura de reação Vilo 5X 1 µL
  - Água sem nuclease 1 µL
  - 10X super script 0,5 µL
- Distribuir esta mistura em tubos PCR de 200 µL (2,5 µL por tubo) mantidos em gelo ou numa grelha de arrefecimento:
- Adicionar 2,5 µL de cada uma das soluções de ARN total diferentes tubos.
- Agitar em vórtice e centrifugar brevemente.
- Colocar os tubos no termociclador na zona de pré-PCR e passar ao **passo 1 do programa Pre-PCR** (Transcrição reversa do ARN para cADN).



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

## Passo 2: Hibridação das sondas .

Este passo deve ser efectuado zona pré-PCR.

- **Reagentes necessários.**

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

- **Hibridação de sondas .**

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

- Centrifugar brevemente.
- Voltar a colocar os tubos no termociclador.
- Verificar a temperatura da tampa aquecida (95°C).
- Avançar para o **passo 2 do programa pré-PCR** (hibridação das sondas).

### Passo 3: Ligation.

Este passo deve ser efectuado zona pré-PCR.

- **Reagentes necessários.**

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

- **Ligação.**

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



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



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

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

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

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

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

- **Reagentes necessários.**

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

- **Amplificação.**

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



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

- Colocar a placa no termociclador na zona pós-PCR.

- Iniciar o **programa 2** (PCR).



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



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

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

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

- **Reagentes necessários.**

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

- **Passo 5.a: Purificação das bibliotecas de sequenciação.**



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

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



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

- **Passo 5.b: Ensaio de sequenciação das bibliotecas.**

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

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

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



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



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

- **Reagentes necessários.**

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

- **Sequenciação num sequenciador Illumina MiSeq.**

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

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

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

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

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

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

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

- Se o pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** for sequenciado sozinho, diluir 3  $\mu$ L de cada primer de sequenciação **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 e GEP- SP-002, se for o controlo interno) num volume final de 600  $\mu$ L de tampão HT1 e, em seguida, colocar estes 600  $\mu$ L no poço 18 do cartucho de

reagentes MiSeq.

- Se o pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** for carregado com outras bibliotecas sequenciadas com primers de sequenciação Illumina, pipetar todo o conteúdo do poço 12 (cerca de 600 µL), adicionar 3 µL de cada primer de sequenciação **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 e GEP-SP-002 se for o controlo interno) e colocar esta mistura no poço 18 do cartucho.

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

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



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

- Em todos os casos, as sequências da biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion** não serão desmultiplexadas pelo sequenciador, mas serão guardadas num ficheiro FastQ "Undetermined", que será depois carregado na plataforma **GENEXPATH RT-MIS**.

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

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

- **Sequenciação numa plataforma Illumina NextSeq 500/550.**

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

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

- Diluir cada biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion** numa concentração entre 0,5 nM e 4 nM, considerando um tamanho médio de fragmento amplificado de 150 pb.
- Agrupar as bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** no volume equivalente.



- Se forem sequenciadas outras bibliotecas na mesma FlowCell, ajustar as concentrações dos diferentes pools e depois combiná-los para obter os números de sequência desejados (mínimo de  $10^5$  sequências para cada biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion**).

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

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

- Desnaturar e diluir o pool final com base nas recomendações do guia Illumina para o sistema NextSeq, para obter uma concentração de carregamento final de 0,8 pM a 1 pM.

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

- Se o pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** for sequenciado sozinho, dilua 6  $\mu$ L de cada primer de sequenciação **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 e GEP-SP002, se for controlo interno) num volume final de 2000  $\mu$ L de tampão HT1 e, em seguida, colocar estes 2 mL no poço 7 do cartucho de reagentes MiSeq.
- Se o pool de bibliotecas **GENEXPATH SarcomaFusion** for combinado com outras bibliotecas sequenciadas com primers de sequenciação Illumina, pipete todo o conteúdo do poço 20 (cerca de 2 ml), adicionar 6  $\mu$ L de cada primer de sequenciação **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 e GEP-SP-002 se for controlo interno) e colocar esta mistura no poço 7 do cartucho.

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

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



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

- Em todos os casos, as sequências da biblioteca **GENEXPATH SarcomaFusion** não

serão desmultiplexadas pelo sequenciador, mas serão guardadas no ficheiro FastQ "Undetermined" (indeterminado), que deverá então ser carregado na plataforma **GENEXPATH RT-MIS**.

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

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

## Passo 7: Análise de Resultados.

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



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

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

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

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

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

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

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

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



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

## Limites do procedimento

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

## Caracterização dos desempenhos

### Desempenho analítico em amostras de referência

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

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

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

- **Quadro 1: Resumo dos resultados do sítio**

amostras	resultado esperado / obtido	valor preditivo	
amostra 1	EWSR1 exão 7 - CREB1 exão 7 EWSR1 exão 7 - CREB1 exão 7	Positivo verdadeiro	6
amostra 2	JAZF1 exão 3 - SUZ12 exão 2 JAZF1 exão 3 - SUZ12 exão 2	Negativo verdadeiro	3
amostra 3	PAX3_7 exão 7 - FOXO exão 2 PAX3_7 exão 7 - FOXO exão 2	Positivo Valor previsto	100%
amostra 4	Negativo Não foi detectada fusão	Recall	100%
amostra 5	SS18 exão 10 - SSX exão 6 SS18 exão 10 - SSX exão 6	Taxa de falsos positivos	0%
amostra 6	PAX3_7 exão 7 - FOXO exão 2 PAX3_7 exão 7 - FOXO exão 2	Sensibilidade	100%
amostra 7	EWSR1 exão 7 - FLI1 exão 6 EWSR1 exão 7 - FLI1 exão 6	Falso positivo	0
linha celular 1	Negativo Não foi detectada fusão	Falso negativo	0
linha celular 2	Negativo Não foi detectada fusão	Valor previsto negativo	100%
		Exatidão	100%
		Taxa de falsos negativos	0%
		<b>Especificidade</b>	<b>100%</b>

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

### Desempenhos analíticos numa coorte de pacientes

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

Sensibilidade= 98,1%

Especificidade= 100%

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

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

## Repetibilidade

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

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

### Repetibilidade intra- corrida

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

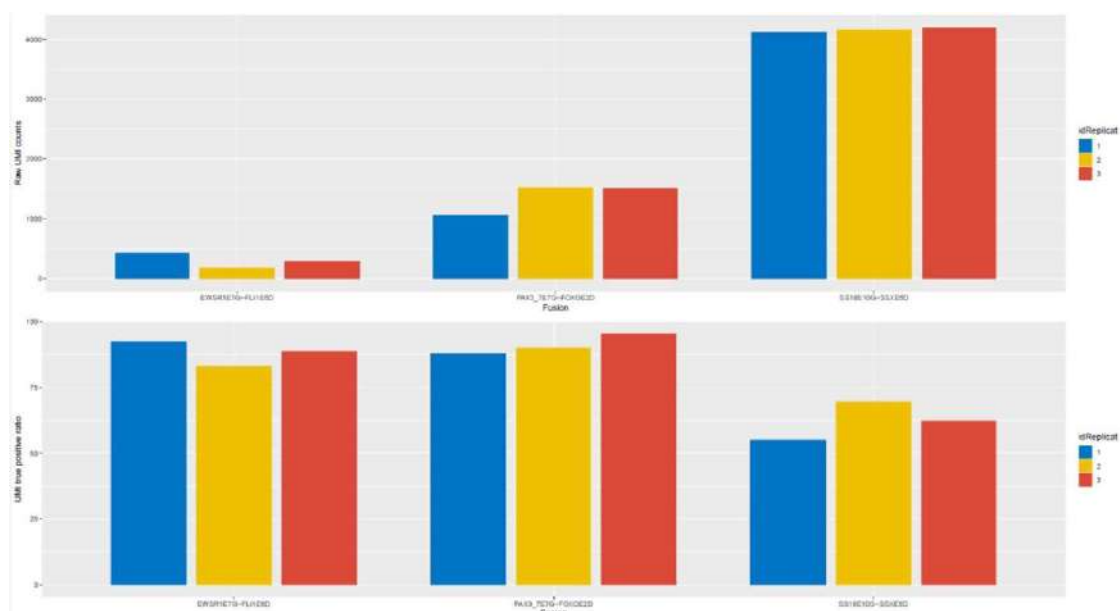


Figura 1: Os histogramas representam, na parte superior, o número bruto de UMIs detectadas e, na parte inferior, o número bruto de UMIs em relação ao número total de UMIs da amostra, de acordo com a fusão esperada e as réplicas.

### Repetibilidade entre corridas

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

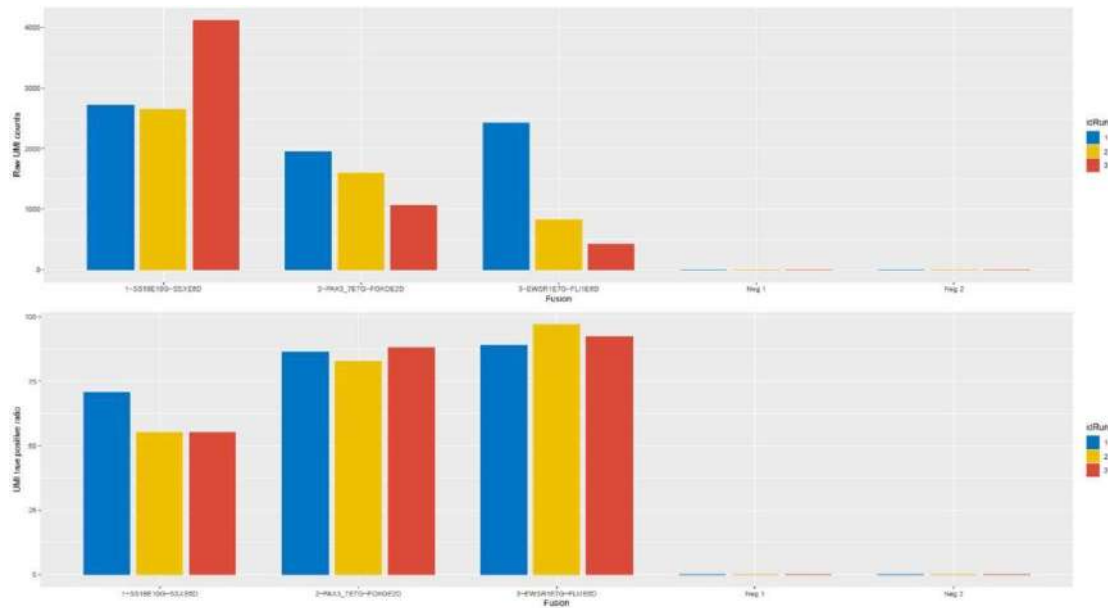


Figura 2: Os histogramas representam, na parte superior, o número bruto de UMI detectadas e, na parte inferior, o número bruto de UMI em relação ao número total de UMI da amostra, de acordo com a fusão esperada e a corrida.

## Reprodutibilidade

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

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

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

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

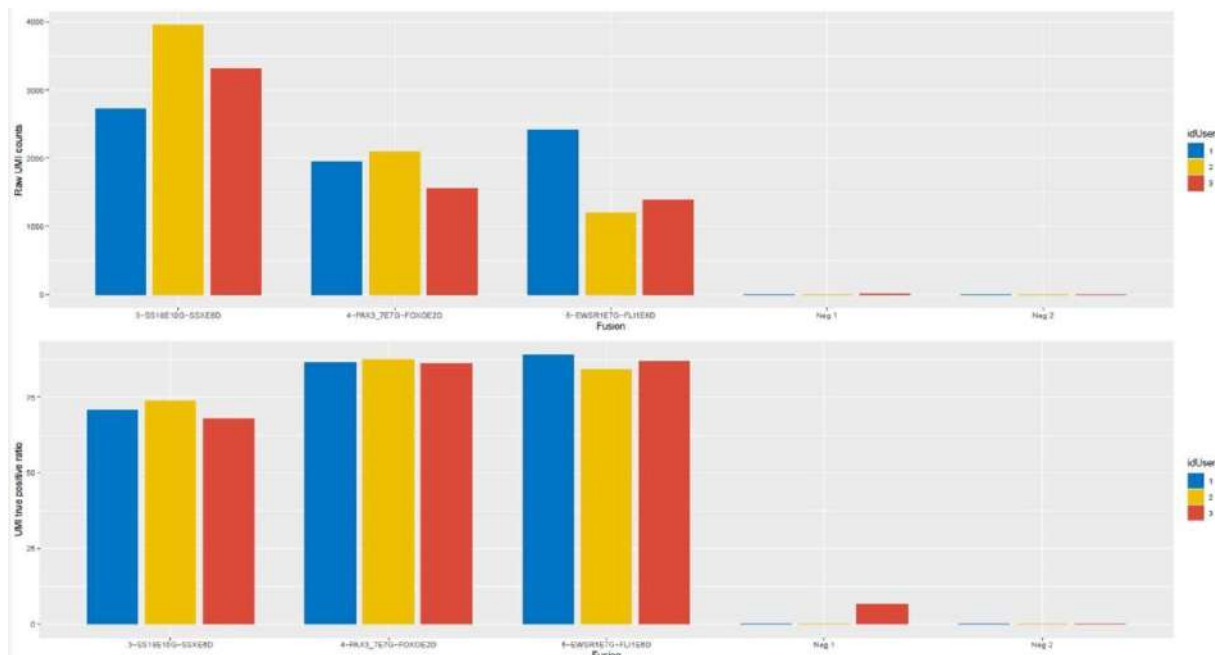


Figura 3: Os histogramas representam, na parte superior, o número bruto de UMI detectadas e, na parte inferior, o número bruto de UMI em relação ao número total de UMI da amostra, de acordo com a fusão esperada e o utilizador.

## Análítico sensibilidade

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

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

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

Os resultados são apresentados na Figura 4.

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

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

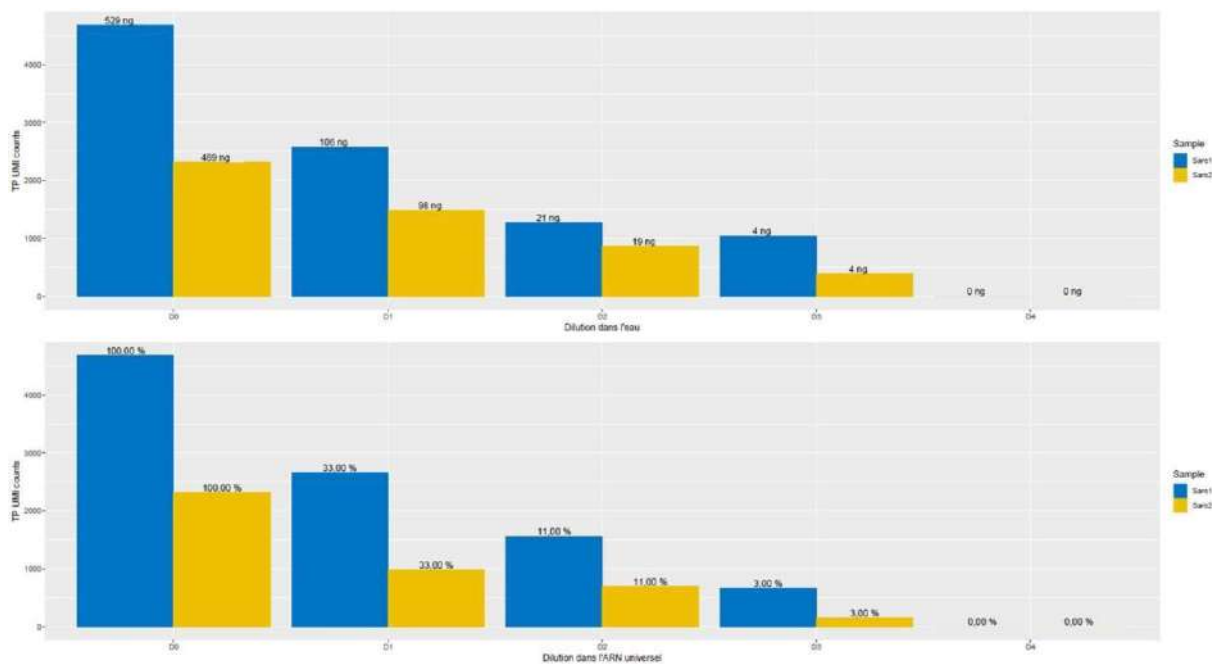











Figura 4: Os histogramas representam o número bruto de UMIs detectadas a partir das fusões esperadas em duas amostras, de acordo com os intervalos de diluição efectuados em água (em cima) ou em ARN universal (em baixo).

## Bibliografia

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

## Tabela de simbolos

 fabricante	 Nome do reagente
 data de fabric	 limite de temperatura
 Prazo de validade	 utilizar o manual de instruções
 Código do lote	 Marcação CE conformidade europeia
	 dispositivo médico de diagnóstico in vitro





## Notas

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

As informações contidas neste documento são susceptíveis de sofrer alterações.