

Febbraio 2017

# Manuale del kit *therascreen*<sup>®</sup> BRCA1/2 NGS FFPE gDNA 1<sup>a</sup> parte: esperimenti

Versione 1

Per l'identificazione delle varianti in *BRCA1* e *BRCA2*

**IVD**

Per uso diagnostico in vitro

Per l'uso con la piattaforma Illumina<sup>®</sup> MiSeqDx<sup>™</sup>

**CE**

**REF**

875011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R2 **MAT**

1103448IT

# Indice generale: 1<sup>a</sup> parte

Uso previsto .....	5
Avvertenza .....	5
Riassunto e spiegazione .....	6
Principio della procedura .....	9
Materiale fornito.....	14
Contenuto del kit .....	14
Materiale necessario ma non fornito .....	15
Prodotti e reagenti necessari.....	15
Controllo positivo .....	16
Materiali di consumo .....	17
Attrezzatura.....	17
Strumenti e reagenti generici .....	17
Strumenti per il sequenziamento.....	18
Software per l'analisi delle sequenze.....	18
Requisiti di sistema consigliati da CLC bio.....	18
Requisiti speciali per la mappatura delle letture .....	19
Requisiti speciali per 3D Molecule Viewer .....	19
Requisiti per il sistema.....	19
Raccomandazioni per il sistema.....	20
Avvertenze e precauzioni .....	21
Precauzioni generali.....	21

---

Conservazione e gestione dei reagenti.....	23
Condizioni per la spedizione.....	23
Condizioni per la conservazione.....	23
Stabilità.....	23
Conservazione e gestione dei campioni .....	24
Procedura: 1° parte .....	25
Schema del flusso di lavoro .....	25
Estrazione del DNA genomico .....	26
Quantificazione del DNA genomico.....	26
Protocollo: Allestimento della PCR target .....	27
Passaggio: Creazione di pool di campioni e purificazione.....	29
Passaggio: Allestimento della libreria.....	30
Passaggio: Pulizia del DNA ligato agli adattatori.....	30
Passaggio: Dimensionamento .....	31
Passaggio: Amplificazione PCR della libreria purificata .....	31
Passaggio: Pulizia della libreria .....	31
Passaggio: Quantificazione della libreria.....	32
Passaggio: Creazione dei pool di librerie .....	33
Diluzione delle librerie a 4 nM e creazione dei pool .....	33
Quantificazione del pool di librerie.....	33
Protocollo: Preparazione della libreria in pool per il sequenziamento .....	35
Denaturazione e diluizione della libreria in pool.....	36
Preparazione del controllo interno PhiX e aggiunta dello stesso alla libreria in pool.....	37

---

Protocollo: Allestimento e avvio del sequenziamento.....	39
Caricamento della libreria in pool sulla cartuccia.....	39
Avvio della seduta di sequenziamento .....	40
Guida alla risoluzione dei problemi .....	44
Riferimenti bibliografici .....	49
Simboli.....	52
Informazioni per gli ordini .....	54

---

# Uso previsto

Il pannello di kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA è un test diagnostico molecolare NGS (Next-Generation Sequencing, sequenziamento di nuova generazione) destinato all'uso per l'identificazione delle varianti nelle regioni codificanti dei geni umani *BRCA1* e *BRCA2* in DNA ottenuto da tessuto tumorale ovarico fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE). Il kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA può fornire un contributo valido per la classificazione dei carcinomi ovarici.

## Avvertenza

Il kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA è stato validato con la piattaforma Illumina MiSeqDx e con il software Biomedical Genomics Workbench (con uno specifico flusso di lavoro di analisi).

**IMPORTANTE:** il manuale è suddiviso in due parti. La 1ª parte contiene un riassunto e una spiegazione, i principi della procedura e la descrizione del flusso di lavoro in un laboratorio umido (wet lab):

- Estrazione del DNA genomico
- Amplificazione PCR del target
- Creazione di pool di campioni e purificazione
- Allestimento della libreria
- Pulizia del DNA legato agli adattatori
- Dimensionamento
- Amplificazione PCR della libreria purificata
- Pulizia, quantificazione e creazione di pool di librerie
- Preparazione della libreria in pool per il sequenziamento

- Allestimento e avvio del sequenziamento
- Guida alla risoluzione dei problemi

La 2ª parte contiene informazioni sull'analisi dei dati e sulle prestazioni del kit:

- Analisi dei dati
  - Installazione del flusso di lavoro per l'analisi
  - Installazione del plug-in per l'analisi
  - Esportazione dei file Illumina FASTQ da MiSeqDx
  - Importazione dei file Illumina FASTQ
  - Analisi della sequenza
- Interpretazione dei risultati
- Guida alla risoluzione dei problemi
- Caratteristiche prestazionali

**IMPORTANTE:** il flusso di lavoro è stato concepito e ottimizzato per determinare le prestazioni descritte nella 1ª e nella 2ª parte del presente manuale. È necessario attenersi scrupolosamente alle istruzioni per l'uso fornite. In caso di mancato rispetto delle istruzioni fornite nella 1ª e nella 2ª parte del presente manuale, le responsabilità di QIAGEN decadranno. Prima di inserire il flusso di lavoro nel ciclo d'uso abituale del laboratorio dell'utente finale, sarebbe opportuno svolgere una verifica indipendente del flusso di lavoro nella sua interezza.

## Riassunto e spiegazione

Ogni anno nel mondo viene diagnosticato un tumore ovarico (OvCa) a più di 200.000 donne. Il tumore ovarico ha il tasso di mortalità più alto tra tutti i tumori ginecologici (1, 2). La stragrande maggioranza delle diagnosi positive riguardano donne con un tumore ovarico in stadio avanzato, la cui sopravvivenza a cinque anni è del 45% circa.

---

I tumori ovarici sono causati dalle mutazioni della linea germinale nel gene *BRCA1/2* nel 15% circa dei casi e da altre mutazioni della linea germinale in percentuale minore. Per contro, una percentuale importante di tumori ovarici è causata da un numero crescente di aberrazioni somatiche (che interessano soltanto la massa tumorale stessa) in alcuni importanti geni onco-soppressori, tra i quali *BRCA1/2* (3, 4).

I tumori ovarici sono in realtà un gruppo eterogeneo di patologie distinte. Circa il 90% di tutti i tumori ovarici è rappresentato dai carcinomi epiteliali, che appartengono a cinque istotipi principali: carcinoma mucinoso, carcinoma endometriode (EC), carcinoma a cellule chiare (CCC), carcinoma sieroso di basso grado (LGSC) e carcinoma sieroso di alto grado (HGSC). L'istotipo HGSC è il primo per prevalenza. La maggioranza dei decessi (70%) si verifica tra pazienti con HGSC in stadio avanzato (III o IV stadio FIGO). Sebbene il carcinoma sieroso di alto grado (HGSC) abbia caratteristiche cliniche distintive rispetto agli altri sottotipi, le pazienti con questo istotipo ottengono comunque risultati diversificati anche se sottoposte agli stessi trattamenti terapeutici o a terapie molto simili (5). Un'ulteriore segmentazione delle pazienti dipende dalle alterazioni molecolari (6).

Attualmente si stima che le mutazioni della linea germinale *BRCA1/2* interessino il 10-20% dei tumori ovarici, con percentuali che possono raggiungere anche il 25% delle pazienti con HGSC (7, 8). Le pazienti che hanno una mutazione nel gene *BRCA1/2* beneficiano di una sopravvivenza globale superiore rispetto alle pazienti che hanno la variante wild-type del gene *BRCA1/2* (9). Inoltre è significativo che le pazienti con alterazioni somatiche nel gene *BRCA1/2* abbiano una prognosi simile a quella delle pazienti con mutazioni della linea germinale *BRCA1/2*. Si stima che le mutazioni somatiche rappresentino il 7% circa dei tumori ovarici tra le pazienti non selezionate (4).

La terapia standard per il tumore ovarico è la chirurgia citoreduttiva, seguita dalla chemioterapia a base di platino. Rispetto ad altri carcinomi solidi, i carcinomi sierosi ad alto grado (HGSC) sono eccezionalmente sensibili ai chemioterapici a base di platino e spesso favoriscono la ripetizione del trattamento. Sebbene molte delle pazienti rispondano alla terapia iniziale, può svilupparsi una resistenza al farmaco e in molti casi può manifestarsi

---

una recidiva con sopravvivenza mediana senza progressione della malattia di appena 18 mesi (10, 11).

Per la prima volta nel 2005 è stata introdotta una nuova strategia terapeutica basata sugli inibitori di PARP (o poli(ADP-ribosio) polimerasi) che, se attuata subito dopo le attività precliniche, sembra essere efficace contro le cellule tumorali che presentano mutazioni nel gene *BRCA*. Le disfunzioni *BRCA1* e *BRCA2*, che determinano l'assenza di ricombinazione omologa, rendono le cellule marcatamente sensibili all'inibizione di PARP tramite letalità sintetica. Le pazienti con tumore ovarico in cui è stata rilevata una mutazione a livello della linea germinale *BRCA1/2* sembrano trarre beneficio clinico dalla terapia basata sugli inibitori di PARP (12-14). Dati clinici recenti confermano l'efficacia degli inibitori di PARP anche nelle pazienti con mutazioni somatiche del gene *BRCA* che non presentano mutazioni a livello della linea germinale. Di conseguenza, il numero di pazienti che potrebbero trarre beneficio da questo trattamento è aumentato (3, 15).

Vista l'enorme importanza delle mutazioni *BRCA1/2* ai fini della prognosi e della cura, in Austria l'Associazione di Oncologia Ginecologica (AGO) ha recentemente emanato la raccomandazione di sottoporre le pazienti con diagnosi di tumore ovarico a test che consentano di determinare la mutazione *BRCA1/2* a livello della linea germinale e di sottoporre altresì il materiale oncologico ai test per il controllo della qualità (16).

Dal momento che la maggior parte dei campioni clinici di tumore ovarico è costituita da campioni FFPE, la successiva analisi del DNA estratto da questi campioni pone delle sfide dal punto di vista della qualità. Mentre altri geni che vengono analizzati su DNA tumorale estratto da campioni FFPE (ad esempio, *KRAS* o *EGFR*) presentano uno spettro di mutazioni clinicamente significative caratterizzato da bassa distribuzione e mutazioni in numero limitato, i geni *BRCA1/2* presentano migliaia di variazioni clinicamente significative. Queste variazioni sono ampiamente distribuite sulle molteplici grandi regioni codificanti e ai confini tra introni ed esoni (17). In più i campioni oncologici sono istologicamente eterogenei (18) e il DNA specifico del tumore contiene percentuali variabili di DNA contaminante di cellule normali.



---

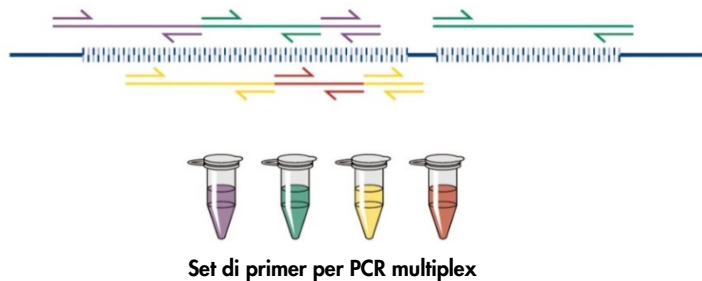
I metodi di sequenziamento del DNA di Sanger potrebbero non avere la sensibilità necessaria per rilevare le alterazioni somatiche di basso livello, inoltre sono difficilmente scalabili per le applicazioni ad elevata produttività. In questo quadro, il sequenziamento di nuova generazione (NGS) offre una soluzione valida per le complessità di questo tipo di analisi, consentendo uno screening completo delle mutazioni nei geni *BRCA1* e *BRCA2*. Questa tecnologia è espressamente consigliata dall'AGO per rilevare le mutazioni più comuni dei geni e cercare di arrivare a una migliore stratificazione delle pazienti (16).

## Principio della procedura

Il kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA è un test PCR basato sugli ampliconi che utilizza 4 miscele di primer multiplex formulate in modo specifico per l'amplificazione di tutte le regioni codificanti dei geni *BRCA1* e *BRCA2*, inclusi i 20 nucleotidi intronici fiancheggianti ciascun esone. La quantità di DNA consigliata per ogni reazione PCR multiplex è di 10 ng di DNA genomico purificato, per un totale di 40 ng.

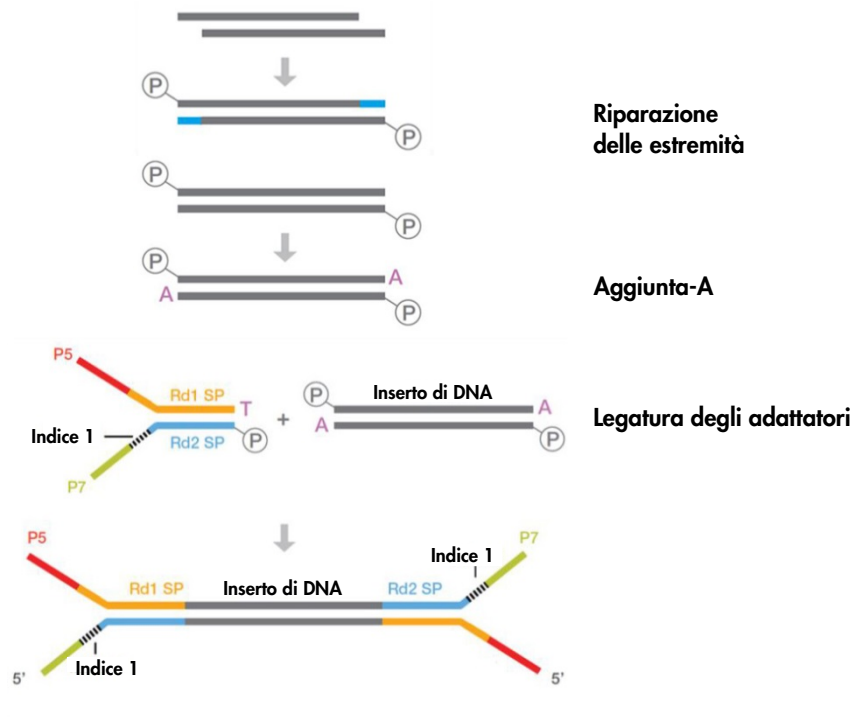
Al termine di ogni reazione PCR, le 4 reazioni di ciascun campione vengono unite in un pool e purificate. Gli ampliconi generati dalla PCR vengono quindi associati a un codice a barre e amplificati applicando un metodo di preparazione delle librerie compatibile con il sistema Illumina MiSeq. Successivamente viene utilizzata una soluzione per PCR quantitativa per eseguire la quantificazione della libreria iniziale, prima di procedere alla normalizzazione della libreria e alla creazione del pool. Viene quindi eseguita una seconda quantificazione della libreria per ottenere una normalizzazione accurata della libreria in pool. A questo punto, la libreria in pool è pronta per essere sottoposta a denaturazione e sequenziamento sulla piattaforma Illumina MiSeqDx. I dati grezzi di sequenziamento a cui è stato applicato il demultiplexing (file FASTQ) vengono quindi importati nel software Genomics Cancer Research Workbench, dove vengono analizzati più approfonditamente per identificare le posizioni delle varianti rispetto alla sequenza di riferimento dei geni *BRCA1* e *BRCA2*.

Al primo passaggio, le regioni codificanti dei geni *BRCA1* e *BRCA2* (inclusi almeno 20 nucleotidi intronici fiancheggianti) vengono amplificate per intero in 4 distinte reazioni PCR multiplex per ogni campione, utilizzando la HotStarTaq® DNA polimerasi su un termociclatore standard (Figura 1). Al termine della reazione, i prodotti della PCR vengono uniti in un pool per ogni campione prima di procedere con la purificazione delle biglie.



**Figura 1. Schema di arricchimento mirato per PCR multiplex.** Il kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA utilizza la tecnologia di arricchimento mirato basato sulla PCR multiplex. I set di primer fiancheggianti vengono distribuiti su un numero adeguato di pool, così da ridurre al minimo i prodotti dell'amplificazione non specifici.

Al secondo passaggio, ogni reazione del prodotto della PCR purificato viene associata a un codice a barre individuale tramite l'aggiunta di adattatori compatibili con il sistema Illumina alle due estremità dell'amplicone (Figura 2).

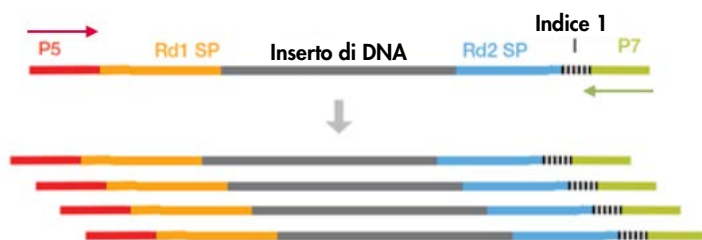


**Figura 2. Preparazione della libreria e schema di legatura degli adattatori.** Viene eseguito un passaggio di riparazione delle estremità (end-repair) che sostanzialmente aggiusta il DNA danneggiato in modo da produrre un DNA con estremità tronche (blunt-ends) fosforilato all'estremità 5'. La reazione Aggiunta-A produce ampliconi a filamento doppio con un nucleotide "A" non appaiato (overhang) all'estremità 3', il quale può legarsi ai nucleotidi dT non appaiati all'estremità 3', che sono presenti sugli adattatori Illumina.

Al termine delle reazioni viene eseguita una reazione di dimensionamento della libreria (fine size selection) che si articola in due passaggi: il primo passaggio rimuove i frammenti della

PCR slegati; il secondo passaggio rimuove i frammenti più grandi applicando un protocollo basato sulle biglie.

Il passaggio successivo consente di aumentare la quantità della libreria PCR. Viene eseguita un'amplificazione PCR simplex per amplificare in modo specifico i frammenti associati al codice a barre (Figura 3).

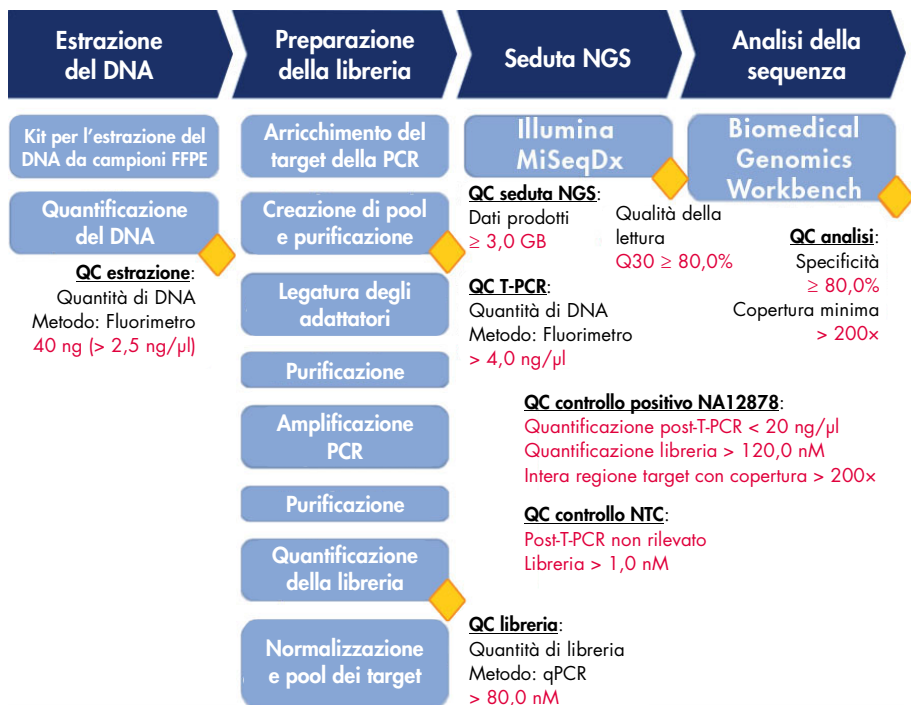


**Figura 3. Schema di amplificazione della libreria.** I primer universali P5 e P7 consentono di amplificare i frammenti etichettati, che presentano adattatori ad entrambe le estremità.

Successivamente ogni libreria amplificata e purificata viene quantificata tramite qPCR e unita in un pool in quantità equimolari. La libreria in pool viene quindi quantificata una seconda volta prima di procedere al sequenziamento.

Il sequenziamento si basa sul protocollo previsto dal produttore del sistema Illumina. I file FASTQ vengono elaborati dal software Biomedical Genomics Cancer Research Workbench con il flusso di lavoro BRCA1/2 CE-IVD. Per ogni campione viene generato un file in formato VCF (Variant Call Format) e, per l'interpretazione delle varianti, si consiglia di utilizzare il software Biomedical Genomics Cancer Workbench.

Per garantire risultati di qualità apprezzabile vengono applicati dei criteri di controllo "in corso" in tutti i diversi passaggi di preparazione della libreria e di sequenziamento (Figura 4). Questi criteri consentono di validare i passaggi del flusso di lavoro, per identificare i campioni che restituiscono risultati di sequenziamento insufficienti o per indicare una potenziale contaminazione.



**Figura 4. Criteri per il controllo qualità "in corso".** Nel corso del flusso di lavoro di sequenziamento (vignette azzurre) vengono eseguiti svariati controlli (rombi gialli) per validare la T-PCR, la preparazione della libreria e la seduta di sequenziamento. Il criterio di qualità finale che assicura la corretta identificazione delle varianti in una determinata posizione è la copertura minima ottenuta. La specificità riguarda la percentuale di letture delle coppie allineate alla regione target.

# Materiale fornito

## Contenuto del kit

<b><i>therascreen</i> BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit</b>	<b>(20)</b>
<b>Numero di catalogo</b>	<b>875011</b>
<b>Numero di campioni</b>	<b>2 × 10</b>
BRCA Primer Mix 1 of 4* (Miscela di primer BRCA 1 di 4)	290 µl
BRCA Primer Mix 2 of 4* (Miscela di primer BRCA 2 di 4)	290 µl
BRCA Primer Mix 3 of 4* (Miscela di primer BRCA 3 di 4)	290 µl
BRCA Primer Mix 4 of 4* (Miscela di primer BRCA 4 di 4)	290 µl
Taq DNA Polymerase (Taq DNA polimerasi) (HotStarTaq 5 unità/µl)	2 × 85 µl
GR NGS Panel 5× PCR Buffer V2	465 µl
Acqua priva di nucleasi (tappo trasparente)	1900 µl

\* In 4 provette di coppie di primer sono state unite 253 coppie di primer formulate in modo da coprire la regione target. Gli ampliconi sono stati progettati con una media di 153 bp (minimo 105 bp, massimo 200 bp).

---

# Materiale necessario ma non fornito

## Prodotti e reagenti necessari

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede di sicurezza sul prodotto (SDS) disponibili presso il fornitore.

Kit da utilizzare per:

- Preparazione del DNA genomico da campioni di tessuto FFPE
- Quantificazione del DNA (preferibilmente con un fluorimetro)
- Purificazione del campione PCR (preferibilmente con una tecnologia basata sulle biglie magnetiche)
- Allestimento della libreria (compatibile con gli strumenti Illumina MiSeq)
- Pulizia della libreria (preferibilmente con una tecnologia su colonna con gel di silice)
- Dimensionamento (preferibilmente con una tecnologia basata sulle biglie magnetiche)
- Amplificazione PCR della libreria purificata
- Quantificazione della libreria (preferibilmente con una tecnologia qPCR)

Oltre ai kit per l'estrazione del DNA genomico, la purificazione dei campioni PCR, l'allestimento della libreria, la pulizia della libreria, il dimensionamento e la quantificazione del DNA, nella Tabella 1 sono elencati i prodotti e i reagenti necessari per completare il flusso di lavoro del kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA.

**Tabella 1. Prodotti e reagenti necessari**

Prodotto/reagente	Fornitore	Funzione	N° di reazioni	N° di catalogo
MiSeq Reagent Kit v2 1/2 e 2/2	Illumina	Cella a flusso, cartuccia e tampone Illumina per il sequenziamento (151 cicli, estremità accoppiate)	Seduta seq.	MS-102-2002
PhiX Control v3	Illumina	Da aggiungere al pool di librerie finale e da usare come controllo durante la seduta di sequenziamento	N/D	FC-110-3001
NaOH 10N	N/D	Per la denaturazione del DNA	N/D	N/D
Etanolo 80%*	N/D	Per i passaggi di purificazione	N/D	N/D
Etanolo 96-100%*	N/D	Per i passaggi di purificazione del DNA genomico	N/D	N/D
Tris-Cl 10 mM, pH 8.5	N/D	Per diluire il controllo interno PhiX	N/D	N/D
Tween 20	N/D	Per diluire il controllo interno PhiX	N/D	N/D
Acqua priva di nucleasi	N/D	Per diluire il DNA	N/D	N/D

N/D = non disponibile

\* Non utilizzare alcol denaturato, che contiene altre sostanze come il metanolo o il metiletilchetone (MEK).

## Controllo positivo

- DNA NA12878 dalla riserva del Coriell Institute for Medical Research, da usare come controllo positivo ([catalog.coriell.org](http://catalog.coriell.org))



---

## Materiali di consumo

- Puntali per pipette per PCR sterili, resistenti alla contaminazione da aerosol, privi di nucleasi, con filtri idrofobici
- 1.5 ml or 2.0 ml LoBind nuclease-free PCR tubes (provette per PCR LoBind prive di nucleasi da 1,5 ml o 2,0 ml) (Eppendorf®, n. cat. 022431021 o 02243048)
- Provette per PCR prive di nucleasi in strisce da 12
- Piastre per PCR da 96 pozzetti compatibili con il termociclatore in dotazione
- Ghiaccio

## Attrezzatura

Assicurarsi che gli strumenti utilizzati in questa procedura siano stati controllati e calibrati nel rispetto delle istruzioni del produttore.

### Strumenti e reagenti generici

- Pipette dedicate (regolabili) (1-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)
- Guanti monouso
- Miscelatore vortex
- Centrifuga da tavolo con rotore per provette di reazione da 0,2 ml e 2 ml (velocità massima 15.000 rpm [20.000 × g])
- Fluorimetro per la quantificazione del DNA
- Termociclatore per l'amplificazione del target della PCR e la quantificazione della libreria

## Strumenti per il sequenziamento

- Illumina MiSeqDx (Illumina, Inc.; n. cat. DX-410-1001)
- Software Illumina MiSeq versione 2.5.0.5 o successiva
- Software Illumina Experiment Manager versione 1.9 o successiva

## Software per l'analisi delle sequenze

- Biomedical Genomics Workbench versione 2.1.1 di CLC bio ([www.clcbio.com](http://www.clcbio.com))
- CLC Genomics Server 7.0.2 con Biomedical Genomics Extension di CLC bio
- QIAGEN GeneRead Panel Analysis Plugin  
Plug-in disponibile per il download sul sito web QIAGEN, scheda **Product Resources** della pagina prodotto dedicata al kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA.
- BRCA 1/2 CE-IVD Workflow  
Flusso di lavoro disponibile per il download sul sito web QIAGEN, scheda **Product Resources** della pagina prodotto dedicata al kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA.

## Requisiti di sistema consigliati da CLC bio

([www.clcbio.com/support/system-requirements](http://www.clcbio.com/support/system-requirements))

- Windows Vista®, Windows® 7, Windows 8, Windows 10, Windows Server 2008 o Windows Server 2012  
Mac OS® 10.7 o successivo  
Linux: Red Hat® 5.0 o successivo; SUSE® 10.2 o successivo; Fedora® 6 o successivo
- Minimo 8 GB di RAM; consigliati 16 GB di RAM
- Minimo schermo da 1024 × 768; consigliato schermo da 1600 × 1200
- Processore Intel® o AMD®
- Minimo 100 GB di spazio libero sul disco nella directory utente temporanea del sistema operativo predefinito

- Minimo 90 GB di spazio libero nella directory CLC\_References (se non è presente una connessione a un server)

Se lo spazio libero disponibile sul disco non è sufficiente, è possibile cambiare il percorso per i dati di riferimento. Vedere [resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/biomedicalgenomicsworkbenchapplication/current/](https://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/biomedicalgenomicsworkbenchapplication/current/). Espandere la sezione **Getting started** (Per iniziare), aprire **Reference data** (Dati di riferimento) e fare clic su **Download and configure reference data** (Scarica e configura i dati di riferimento).

## Requisiti speciali per la mappatura delle letture

I numeri forniti di seguito indicano i requisiti di memoria minimi e consigliati per i sistemi che eseguono le attività di mappatura e analisi. I requisiti sono consigliati sulla base della dimensione del genoma.

- Umano (3,2 GB), di topo (2,7 GB)
    - Minimo: 6 GB di RAM; consigliati: 8 GB di RAM
- I sistemi con meno memoria di quella specificata potranno trarre beneficio dall'installazione del plug-in obsoleto read mapper (vedere [www.clcbio.com/clc-plugin/read-mapper-legacy-version](http://www.clcbio.com/clc-plugin/read-mapper-legacy-version)). La mappatura sarà più lenta dello standard ma è una soluzione al problema della quantità di memoria disponibile.

## Requisiti speciali per 3D Molecule Viewer

### Requisiti per il sistema

- Una scheda grafica in grado di supportare OpenGL® 2.0
  - Driver di grafica aggiornati
- Assicurarsi di avere installato il driver più aggiornato per la scheda grafica.

---

## Raccomandazioni per il sistema

- Una scheda grafica discreta, prodotta da NVIDIA® o AMD/ATI™  
È possibile utilizzare anche le moderne schede grafiche integrate (ad esempio, serie Intel HD Graphics), ma queste sono generalmente più lente delle schede discrete.
- È consigliata una versione workbench a 64 bit per lavorare con complessi di grandi dimensioni

---

# Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede di sicurezza sul prodotto (SDS). Le schede sono disponibili online in formato PDF sul sito [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), dove è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS di ogni kit e componente del kit QIAGEN.

## Precauzioni generali

L'uso dei test NGS deve avvenire nel rispetto delle buone pratiche di laboratorio, inclusa la manutenzione e la calibrazione di tutte le apparecchiature in uso, e conformemente ai regolamenti e agli standard pertinenti.

- Smaltire campioni e materiali di scarto nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.
- I reagenti contenuti nel kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA sono diluiti in modo ottimale. Non diluire ulteriormente i reagenti per non rischiare un calo delle prestazioni.
- Tutti i reagenti forniti con il kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA sono destinati esclusivamente all'uso con gli altri reagenti del medesimo kit. Non sostituire i reagenti del kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA con i reagenti di altri kit dello stesso tipo, altrimenti le prestazioni potrebbero risentirne.
- Non utilizzare i componenti del kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA e degli altri kit necessari ma non forniti se sono scaduti oppure sono stati conservati o trasportati in modo scorretto. Verificare sempre prima dell'uso.
- In caso di alterazione dei tempi e/o delle temperature di incubazione, i dati generati potrebbero essere erranei o discordanti.

- 
- Procedere con cautela per assicurare il corretto svolgimento dei test sui campioni, con particolare attenzione agli errori di inserimento dei campioni, di caricamento e di lettura del codice a barre.
  - Gestire i campioni in modo sistematico per garantire la corretta identificazione e tracciabilità degli stessi in qualsiasi momento.
  - Prestare particolare attenzione alla prevenzione della contaminazione crociata.
  - Prestare particolare attenzione alla prevenzione della contaminazione da carryover del prodotto della PCR, con conseguente segnale falso positivo.
  - Prestare particolare attenzione alla prevenzione della contaminazione da DNasi, con conseguente degradazione degli stampi di DNA.
  - Utilizzare materiale da laboratorio privo di nucleasi (ad esempio, pipette, puntali per pipette, fiale di reazione). Utilizzare puntali per pipette nuovi, resistenti alla contaminazione da aerosol, durante tutti i passaggi del pipettamento per evitare la contaminazione crociata di campioni e reagenti.
  - Preparare la miscela Master Mix pre-PCR con materiale dedicato (pipette, puntali e così via) in un'area riservata dove non vengano introdotte matrici di DNA (cDNA, plasmidi o prodotti della PCR). Aggiungere il template in un'area separata (preferibilmente in un'altra stanza) con materiale specifico (pipette, puntali e così via).
  - Per ulteriori avvertenze, precauzioni e procedure, consultare il manuale utente dello strumento Illumina MiSeqDx. La piattaforma NGS deve essere installata facendo attenzione all'alimentazione elettrica e, dopo l'avvio, va evitata qualsiasi interazione tra l'utente e la piattaforma.
  - Non aprire lo strumento Illumina MiSeqDx finché la seduta non è finita.

# Conservazione e gestione dei reagenti

## Condizioni per la spedizione

Il kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA viene spedito in ghiaccio secco. Qualora uno dei componenti del kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA non dovesse essere congelato alla consegna, o la confezione esterna dovesse essersi aperta durante il trasporto, o la scatola non dovesse contenere la nota di accompagnamento o i reagenti, contattare il servizio tecnico QIAGEN o il distributore locale (visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Condizioni per la conservazione

Alla consegna riporre immediatamente il kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA in un congelatore termoregolato e conservarlo a una temperatura compresa tra -15 e -30°C. Fare attenzione a proteggere le miscele qPCR dalla luce.

Per informazioni sulla conservazione dei reagenti e dei kit non forniti, fare riferimento ai rispettivi manuali.

## Stabilità

Se conservato alle condizioni specificate, il kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA è stabile fino alla data di scadenza indicata.

Dopo l'apertura, i reagenti possono essere conservati nella loro confezione originale a una temperatura compresa tra -15 e -30°C, fino alla data di scadenza riportata sulla confezione. Non superare il numero massimo di 5 cicli di congelamento/scongelo.

Per informazioni sulla stabilità dei reagenti e dei kit non forniti, fare riferimento ai rispettivi manuali.

---

# Conservazione e gestione dei campioni

Il materiale campione deve essere DNA genomico umano estratto da tessuto FFPE.

Il trasporto deve avvenire secondo la metodologia di patologia standard per garantire la qualità dei campioni.

Conservare tutti i blocchi e i vetrini FFPE a temperatura ambiente, tra 15°C e 25°C, in conformità allo standard CLSI MM13-A (19). Le condizioni per il trasporto dei blocchi FFPE e le condizioni per la conservazione sono analoghe.

I vetrini possono essere conservati a temperatura ambiente per 1 mese al massimo prima dell'estrazione del DNA.

Il DNA ottenuto dai tessuti FFPE deve essere preparato fresco al momento, oppure può essere conservato a temperature comprese tra 4°C e 8°C per brevi periodi o tra -15°C e -30°C per periodi più lunghi.



# Procedura: 1<sup>a</sup> parte

## Schema del flusso di lavoro

Gli elementi del flusso descritti nello schema sottostante sono stati ottimizzati per la procedura descritta e includono anche i passaggi da eseguire con i kit e i reagenti che non vengono forniti.



Leggere attentamente la procedura descritta e fare riferimento esclusivamente alle istruzioni fornite nella 1<sup>a</sup> e nella 2<sup>a</sup> parte di questo manuale.

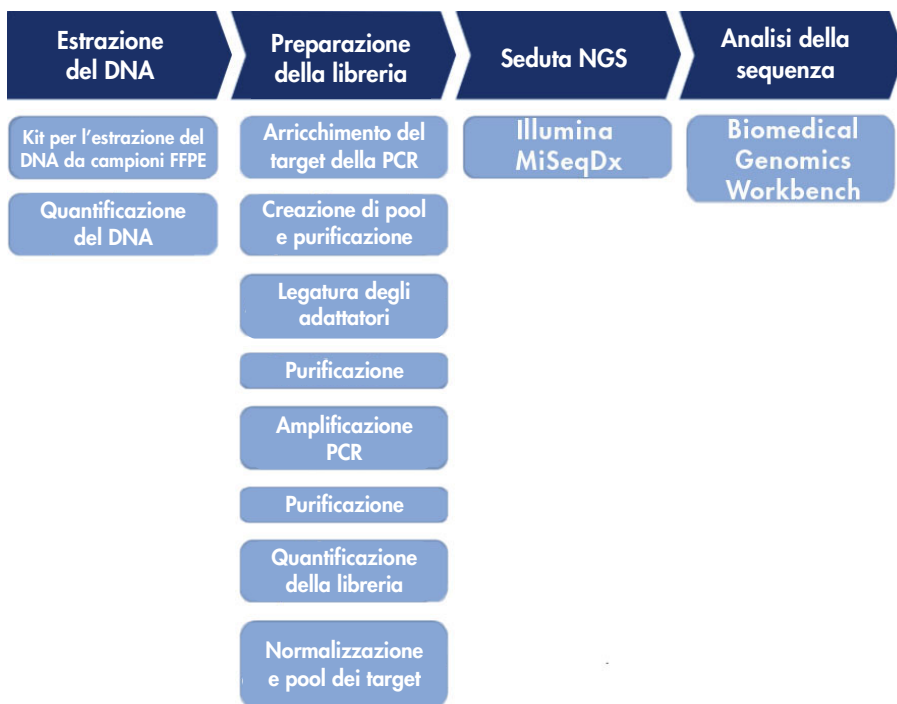


Figura 5. Schema del flusso di lavoro NGS.

---

## Estrazione del DNA genomico

Utilizzare un kit per purificare il DNA genomico ottenuto dalla preparazione dei campioni FFPE di tumore ovarico.

## Quantificazione del DNA genomico

Per una quantificazione accurata del DNA e una conseguente concentrazione ottimale del DNA, si consiglia di utilizzare un fluorimetro e un kit di dosaggio che consentano di quantificare il DNA per l'intero intervallo di concentrazioni iniziali del campione: tra 100 pg/ $\mu$ l e 1000 ng/ $\mu$ l.

La concentrazione del DNA di un campione deve essere  $\geq 2,5$  ng/ $\mu$ l per assicurare una quantità di campione sufficiente per gli esperimenti successivi.

Se la quantità di DNA è insufficiente, estrarre altro tessuto tumorale eventualmente disponibile (vedere la "Guida alla risoluzione dei problemi" a pagina 44).

## Protocollo: Allestimento della PCR target

Il kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA consente di analizzare in totale 20 campioni in due sedute di sequenziamento. In ogni seduta di sequenziamento si consiglia di includere 10 campioni, più un controllo positivo NA12878 e acqua priva di nucleasi come controllo senza template (NTC). Distribuire i campioni in una piastra per PCR a 96 pozzetti, rispettando lo schema di distribuzione illustrato nella Figura 6.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
B	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Miscela di primer 1 di 4 C	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10	Controllo positivo	NTC
Miscela di primer 2 di 4 D	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10	Controllo positivo	NTC
Miscela di primer 3 di 4 E	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10	Controllo positivo	NTC
Miscela di primer 4 di 4 F	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10	Controllo positivo	NTC
G	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
H	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Figura 6. Schema di distribuzione della piastra per PCR target a 96 pozzetti.

### Procedura

1. Scongellare i reagenti su ghiaccio.
2. Diluire il DNA (incluso il controllo positivo NA12878) a una concentrazione di 2,5 ng/µl con acqua priva di nucleasi in una provetta LoBind. Per ogni campione occorrono 10 ng (4 µl, 2,5 ng/µl) per reazione PCR, complessivamente quindi 40 ng.

3. Si consiglia di includere 10 campioni, più un controllo positivo NA12878 e un controllo NTC, in ogni seduta di sequenziamento. Preparare le strisce PCR o una piastra per PCR a 96 pozzetti, a seconda del numero di reazioni. Aggiungere le etichette con i nomi dei campioni e i numeri dei pool.
4. Preparare le 4 pre-miscele T-PCR su ghiaccio, seguendo le istruzioni contenute nella Tabella 2 più avanti. Per ogni campione occorreranno 4 pre-miscele T-PCR. Miscelare delicatamente pipettando verso l'alto e verso il basso.

**Tabella 2. Preparazione delle pre-miscele T-PCR per ogni pool di miscela di primer**

<b>Componente</b>	<b>1 reazione +10% extra</b>	<b>12 reazioni +10% extra</b>
Miscela di primer BRCA 1, 2, 3 o 4 di 4	11 µl	132 µl
Taq DNA polimerasi (HotStarTaq, 5 unità/µl)	1,5 µl	18 µl
GR NGS Panel 5x PCR Buffer V2	4,4 µl	52,8 µl
Acqua priva di nucleasi	0,7 µl	8,4 µl
<b>Volume totale</b>	<b>17,6 µl</b>	<b>211,2 µl</b>

5. Distribuire 16 µl di pre-miscela T-PCR nei pozzetti di una piastra a 96 pozzetti, rispettando lo schema illustrato nella Figura 6.
6. Aggiungere 4 µl di ciascun campione di DNA nella miscela di reazione di ogni reazione PCR, rispettando lo schema illustrato nella Figura 6. Miscelare delicatamente pipettando verso l'alto e verso il basso.

7. Sigillare i pozzetti prima di caricare la piastra su un termociclatore e programmare le condizioni riportate nella Tabella 3.

**Tabella 3. Condizioni di ciclaggio**

Durata	Temperatura	Cicli
15 minuti	95°C	1
15 secondi	95°C	26
150 secondi	60°C	
10 minuti	72°C	1

8. Al termine della reazione, proseguire con il "Passaggio: Creazione di pool di campioni e purificazione" a pagina 29.

**Nota:** se i campioni devono essere conservati prima della purificazione, mantenerli a una temperatura compresa tra -15°C e -30°C.

**Nota:** è possibile ritardare l'avvio della seduta T-PCR di 6 ore al massimo prima di dare inizio alla reazione PCR, ma solo se le miscele di reazione sono conservate a 2-8°C.

## Passaggio: Creazione di pool di campioni e purificazione

Le 4 reazioni T-PCR ottenute dalla PCR target vengono unite creando un unico pool dei prodotti della PCR per ogni campione. Il pool dei prodotti della PCR deve essere purificato, preferibilmente con una tecnologia basata sulle biglie magnetiche, prima di procedere alla preparazione della libreria.

Trasferire circa 25 µl del surnatante di ogni campione in una provetta LoBind da 1,5 ml pulita, quindi determinare la concentrazione del DNA dei campioni, preferibilmente con un fluorimetro.

**Nota:** se i campioni devono essere conservati prima dell'allestimento della libreria, mantenerli a una temperatura compresa tra -15°C e -30°C.

---

Prima di procedere all'allestimento della libreria, applicare i criteri per il controllo qualità ai campioni di DNA facendo riferimento alle istruzioni fornite di seguito.

### **Criteri per il controllo qualità**

Utilizzare un fluorimetro per misurare le concentrazioni del pool di campioni di DNA arricchiti con la PCR, del controllo positivo e del controllo NTC.

- La concentrazione del controllo positivo NA12878 deve essere  $> 20 \text{ ng}/\mu\text{l}$  se non si sono verificati errori durante i passaggi di T-PCR e purificazione.
- Il controllo NTC deve generare un risultato "not detected" (non rilevato). La presenza di DNA rilevabile indica una potenziale contaminazione della PCR e/o della purificazione.
- La concentrazione del DNA dei campioni 1-10 arricchiti con la PCR deve essere  $> 4 \text{ ng}/\mu\text{l}$  per assicurare la qualità del campione per gli esperimenti successivi.

Se vi sono segni di contaminazione, o la concentrazione del DNA campione o del controllo positivo è insufficiente, vedere la "Guida alla risoluzione dei problemi" a pagina 44.

### Passaggio: Allestimento della libreria

Allestire la libreria utilizzando i reagenti e gli adattatori compatibili con gli strumenti Illumina MiSeq.

### Passaggio: Pulizia del DNA ligato agli adattatori

Ripulendo il DNA ligato agli adattatori con una tecnologia su colonna con gel di silice, è possibile rimuovere i frammenti di DNA  $< 150 \text{ bp}$  dopo l'allestimento della libreria.

---

## Passaggio: Dimensionamento

Dopo l'allestimento della libreria, questo passaggio consente di rimuovere i frammenti di grandi dimensioni con una tecnologia basata sulle biglie magnetiche.

Trasferire circa 17  $\mu$ l di ciascun surnatante in una provetta LoBind da 1,5 ml pulita.

**Nota:** le dimensioni mediane del DNA della libreria dovrebbero essere di 280 bp.

## Passaggio: Amplificazione PCR della libreria purificata

Con l'amplificazione ad alta fedeltà, è possibile assicurare che la quantità di DNA della libreria sarà sufficiente per il successivo passaggio di sequenziamento.

## Passaggio: Pulizia della libreria

Una tecnologia su colonna con gel di silice consente di rimuovere i primer, i nucleotidi, le polimerasi e i sali dalla libreria amplificata.

**Nota:** prima della quantificazione, è possibile conservare la libreria in congelatore a una temperatura compresa tra  $-15^{\circ}\text{C}$  e  $-30^{\circ}\text{C}$ .

---

## Passaggio: Quantificazione della libreria

La quantificazione accurata delle molecole amplificabili della libreria è un passaggio cruciale per garantire la qualità ottimale delle letture e per generare dati in modo efficiente. Questo passaggio prevede l'uso di un kit di quantificazione delle librerie mediante qPCR compatibile con le librerie Illumina.

### **Criteri per il controllo qualità**

- La concentrazione del controllo positivo NA12878 deve essere  $> 120$  nM se non si sono verificati errori e conseguenti perdite di DNA durante le procedure di allestimento, amplificazione e purificazione della libreria.
- La concentrazione del controllo NTC deve essere  $< 1,0$  nM se non si sono verificate contaminazioni durante le procedure di allestimento, amplificazione e purificazione della libreria.
- La concentrazione di una libreria di campioni deve essere  $> 80$  nM per assicurare la qualità del campione per gli esperimenti successivi.

Se vi sono segni di contaminazione, o la concentrazione del DNA campione o del controllo positivo è insufficiente, vedere la "Guida alla risoluzione dei problemi" a pagina 44.



## Passaggio: Creazione dei pool di librerie

Il kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA consente di analizzare 20 campioni di tumore in due sedute di sequenziamento. Si consiglia di includere 10 campioni, più un controllo positivo NA12878 e un controllo NTC, in ogni seduta di sequenziamento. Le librerie costituite da 10 campioni più i controlli vengono diluite a 4 nM e unite in un pool, dopodiché il pool viene quantificato. Ciò consente di ottenere un pool di librerie con una concentrazione finale di 14 pM dopo la denaturazione.

### Diluizione delle librerie a 4 nM e creazione dei pool

**Nota:** prestare particolare attenzione durante la creazione dei pool di librerie.

Preparare le diluizioni dei 10 campioni della libreria e del controllo positivo NA12878, così da ottenere una concentrazione finale di 4 nM in acqua priva di nucleasi (fare riferimento alle concentrazioni iniziali della libreria calcolate nel passaggio precedente). Le librerie costituite da 10 campioni, dal controllo positivo NA12878 e dal controllo negativo così diluite vengono unite in un pool.

### Quantificazione del pool di librerie

Questo passaggio prevede l'uso di un kit di quantificazione delle librerie mediante qPCR compatibile con le librerie Illumina.

Prima di proseguire con il "Protocollo: Preparazione della libreria in pool per il sequenziamento" a pagina 35, controllare la quantificazione del pool applicando i criteri per il controllo qualità descritti di seguito.

#### **Criteri per il controllo qualità**

- La concentrazione del controllo NTC deve essere  $< 1$  pM se non si sono verificate contaminazioni durante la creazione del pool.
- La concentrazione della libreria in pool deve essere circa 4 nM per assicurare la qualità del pool per il sequenziamento.

---

Se la concentrazione della libreria in pool è insufficiente, vedere la “Guida alla risoluzione dei problemi”, page 44.

## Protocollo: Preparazione della libreria in pool per il sequenziamento

Questo protocollo prevede due procedure:

- Denaturazione e diluizione della libreria in pool
- Preparazione del controllo interno PhiX e aggiunta dello stesso alla libreria in pool

**Nota:** nella *Guida alla denaturazione e alla diluizione delle librerie del sistema MiSeq* e nella *Guida per l'utente del sistema MiSeq* pubblicate da Illumina sono disponibili descrizioni dettagliate sulla denaturazione delle librerie e sulla preparazione di una seduta con il sistema Illumina MiSeq.

### Reagenti necessari per il protocollo

- NaOH 10N
- MiSeq Reagent Kit v2 1/2 e 2/2
- PhiX Control v3
- Tris-Cl 10 mM, pH 8,5 con 0,1% di Tween 20 per diluire PhiX

### Punti importanti prima di iniziare

- Preparare sempre al momento l'idrossido di sodio (NaOH) diluito per la denaturazione delle librerie. Questo passaggio è cruciale per il processo di denaturazione.
- Per impedire che piccoli errori di pipettamento influenzino la concentrazione finale di NaOH, preparare almeno 1 ml di NaOH diluito al momento.
- Per risultati ottimali, iniziare a scongelare la cartuccia dei reagenti prima di eseguire la denaturazione e la diluizione delle librerie. Per ulteriori istruzioni, vedere la *Guida per l'utente del sistema MiSeq*.

## Prima di iniziare

- Preparare NaOH 0,2 N diluito al momento.

Unire i volumi seguenti in una provetta per microcentrifuga:

- Acqua da laboratorio (800  $\mu$ l)
- NaOH 1,0 N di stock (200  $\mu$ l)

Il risultato è 1 ml di NaOH 0,2 N.

- Prelevare la provetta di HT1 (tampone di ibridazione; fornita nel kit) conservata a una temperatura compresa tra -15 e -30°C e lasciarla scongelare a temperatura ambiente. Una volta scongelata, conservare la provetta a 2-8°C finché non verrà il momento di diluire le librerie denaturate.

## Denaturazione e diluizione della libreria in pool

### Procedura

1. Denaturare la libreria in pool aggiungendo 5  $\mu$ l di NaOH 0,2 N ai 5  $\mu$ l della libreria in pool, agitare brevemente in vortex, centrifugare a impulsi e infine incubare per 5 minuti a temperatura ambiente.

**Nota:** utilizzare sempre NaOH diluito al momento.

2. Arrestare la reazione di denaturazione aggiungendo 990  $\mu$ l di HT1 pre-raffreddato nella provetta contenente il DNA denaturato.
3. Diluire il DNA denaturato a 14 pM utilizzando il tampone HT1 pre-raffreddato in un volume finale di 600  $\mu$ l, tenendo conto della concentrazione iniziale della libreria in pool.

Ad esempio, se la concentrazione calcolata della libreria in pool era di 20 pM dopo la denaturazione, regolare la concentrazione a 14 pM pipettando 180  $\mu$ l di tampone HT1 pre-raffreddato in 420  $\mu$ l di DNA denaturato. Capovolgere la provetta svariate volte per miscelare il contenuto.

4. Conservare su ghiaccio il DNA denaturato e diluito finché non verrà il momento di caricare la libreria.

Preparazione del controllo interno PhiX e aggiunta dello stesso alla libreria in pool

### Procedura

1. Diluire la libreria del controllo interno PhiX a 4 nM, unendo i volumi dei componenti illustrati nella Tabella 4.

**Tabella 4. Diluizione del controllo interno PhiX a 4 nM**

Componente	Volume
Libreria del controllo interno PhiX 10 nM	2 µl
Tris-Cl 10 mM, pH 8,5 con 0,1% di Tween 20	3 µl

2. Denaturare la libreria del controllo interno PhiX a 4 nM unendo i volumi dei componenti illustrati nella Tabella 5.

**Tabella 5. Denaturazione PhiX**

Componente	Volume
Libreria del controllo interno PhiX 4 nM	5 µl
NaOH 0,2 N	5 µl

3. Centrifugare a impulsi la provetta e incubare per 4,5 minuti a temperatura ambiente.
4. Arrestare la reazione di denaturazione aggiungendo 990 µl di tampone HT1 pre-raffreddato.
5. Diluire la libreria del controllo interno PhiX 20 pM denaturata fino a 12,5 pM, miscelando 375 µl di PhiX 20 pM con 225 µl di tampone HT1 pre-raffreddato. Capovolgere la provetta svariate volte per miscelare il contenuto.
6. Aggiungere 6 µl di PhiX 12,5 pM ai 600 µl di libreria diluita. Agitare in vortex e centrifugare per 1 minuto a 1000 × g, quindi collocare su ghiaccio.

---

Proseguire con il "Protocollo: Allestimento e avvio del sequenziamento" a pagina 39.

## Protocollo: Allestimento e avvio del sequenziamento

Questo protocollo prevede due procedure:

- Caricamento della libreria in pool sulla cartuccia dei reagenti MiSeq
- Avvio della seduta di sequenziamento

### Caricamento della libreria in pool sulla cartuccia

**Nota:** nella *Guida per l'utente del sistema MiSeq* è descritto nel dettaglio l'allestimento di una seduta Illumina MiSeq.

### Reagenti necessari per il protocollo

- MiSeq Reagent Kit v2 1/2 e 2/2

### Prima di iniziare

- Prelevare la cartuccia dei reagenti (fornita con il kit) conservata a una temperatura compresa tra -15 e -30°C. Collocare la cartuccia dei reagenti in un bagnomaria di acqua deionizzata a temperatura ambiente in quantità sufficiente per immergervi la base fino alla linea del livello dell'acqua segnata sulla cartuccia dei reagenti stessa. Evitare che l'acqua superi il livello indicato.
- Lasciare scongelare la cartuccia dei reagenti nel bagnomaria a temperatura ambiente per un'ora circa, o fino al completo scongelamento.

### Procedura

1. Rimuovere la cartuccia dal bagnomaria e picchiettarla gentilmente sul tavolo per rimuovere l'acqua dalla base. Asciugare la base della cartuccia. Assicurarsi che gli schizzi d'acqua non abbiano bagnato la parte superiore della cartuccia dei reagenti.
2. Capovolgere la cartuccia dei reagenti dieci volte per miscelare i reagenti scongelati, quindi controllare visivamente che tutte le posizioni si siano scongelate. Controllare il

reagente nella posizione 1 per verificare che sia completamente miscelato e privo di precipitati.

3. Picchiettare delicatamente la cartuccia sul tavolo per ridurre le bolle d'aria nei reagenti. Collocare su ghiaccio la cartuccia dei reagenti o conservarla a 2-8°C finché non verrà il momento di allestire la seduta. Per ottenere risultati ottimali, procedere direttamente con il passaggio 4.
4. Controllare visivamente l'integrità del sigillo in alluminio, quindi utilizzare un puntale per pipetta da 1 ml per perforare il sigillo sul serbatoio della cartuccia dei reagenti con l'etichetta "Load Samples" (Caricamento reagenti).
5. Pipettare 600 µl della libreria in pool denaturata e diluita con il controllo PhiX nel serbatoio "Load Samples" (Caricamento reagenti), nella posizione per campioni n. 17 della cartuccia.

## Avvio della seduta di sequenziamento

**Nota:** nella *Guida per l'utente del sistema MiSeq* è descritto nel dettaglio l'allestimento di una seduta Illumina MiSeq.

**Nota:** nella pubblicazione *Illumina Experiment Manager User Guide* (Guida per l'utente di Illumina Experiment Manager) è descritto in modo dettagliato come creare e modificare i fogli campioni per gli strumenti e il software di analisi Illumina.

## Prima di iniziare

- Pulire la cella a flusso Illumina (contenuta nel MiSeq Reagent Kit v2 1/2) rispettando le istruzioni fornite dal produttore. La cella a flusso è un dispositivo monouso.
- Illumina consiglia di creare il foglio campione prima di preparare il campione.

## Procedura

1. Riavviare il sistema MiSeq con la modalità **Research** (Ricerca), quindi selezionare la modalità **Sequence** (Sequenziamento).



2. Quando compare la schermata **Load Flow Cell** (Carica cella a flusso), caricare la cella a flusso.
3. Quando compare la schermata **Load Reagents** (Carica reagenti), svuotare il flacone degli scarti. Prelevare il flacone contenente MiSeq SBS Solution (PR2) conservato a 2-8°C. Capovolgerlo per miscelare il contenuto, rimuovere il tappo e caricare immediatamente il flacone di PR2.
4. Selezionare il foglio campione appropriato in base al set di codici a barre dell'adattatore selezionato durante il passaggio di legatura degli adattatori.
5. In Illumina Experiment Manager selezionare l'opzione **Create Sample Sheet** (Crea foglio campione). Nella finestra **Select Category** (Seleziona categoria) scegliere **Other** (Altro) e **FASTQ Only** (Solo FASTQ).
6. Nella finestra **FASTQ Only Run Setting** (Impostazione corsa solo FASTQ) selezionare **TruSeqLT**, scegliere **1 Index Read** (Lettura indice 1), selezionare **Paired End Sequencing** (Sequenziamento delle estremità accoppiate) e **151** per **Cycles Read 1** (Cicli lettura 1) e **Cycles Read 2** (Cicli lettura 2), infine selezionare **Use Adapter Trimming** (Usa trimming adattatori) e **Use Adapter Trimming Read 2** (Usa trimming adattatori lettura 2).
7. Scegliere gli adattatori in base a quelli selezionati per la preparazione della libreria (vedere la Tabella 6 più avanti).

**Nota:** si consiglia di utilizzare Illumina Experiment Manager per creare un nuovo foglio campione per ciascun esperimento di sequenziamento. Non aprire e non modificare il foglio campione prima dell'uso.

**Tabella 6. Adattatori e codici a barre disponibili**

Generead Adapter I Set A 12-Plex		Generead Adapter I Set B 12-Plex	
Nome adattatore	Codice a barre	Nome adattatore	Codice a barre
Adapter Bc 1 Illumina	ATCACG	Adapter Bc 13 Illumina	AGTCAA
Adapter Bc 2 Illumina	CGATGT	Adapter Bc 14 Illumina	AGTTCC
Adapter Bc 3 Illumina	TTAGGC	Adapter Bc 15 Illumina	ATGTCA
Adapter Bc 4 Illumina	TGACCA	Adapter Bc 16 Illumina	CCGTCC
Adapter Bc 5 Illumina	ACAGTG	Adapter Bc 18 Illumina	GTCCGC

Generead Adapter I Set A 12-Plex		Generead Adapter I Set B 12-Plex	
Adapter Bc 6 Illumina	GCCAAT	Adapter Bc 19 Illumina	GTGAAA
Adapter Bc 7 Illumina	CAGATC	Adapter Bc 20 Illumina	GTGGCC
Adapter Bc 8 Illumina	ACTTGA	Adapter Bc 21 Illumina	GTTTCG
Adapter Bc 9 Illumina	GATCAG	Adapter Bc 22 Illumina	CGTACG
Adapter Bc 10 Illumina	TAGCTT	Adapter Bc 23 Illumina	GAGTGG
Adapter Bc 11 Illumina	GGCTAC	Adapter Bc 25 Illumina	ACTGAT
Adapter Bc 12 Illumina	CTTGTA	Adapter Bc 27 Illumina	ATTCCT

8. Selezionare **Finish** (Fine) e salvare il file del foglio campione nella cartella MiSeq desiderata.
9. Dopo aver caricato la cella a flusso e i reagenti, esaminare i parametri ed eseguire un controllo preliminare.
10. Esaminare **Experiment Name** (Nome esperimento), **Analysis Workflow** (Flusso di lavoro di analisi) e **Read Length** (Lunghezza lettura). Questi parametri sono specificati nel foglio campione.
11. Esaminare i percorsi delle cartelle nell'angolo in basso a sinistra.  
Se sono necessarie delle modifiche, selezionare **Change Folders** (Cambia cartelle).  
Dopo aver completato le modifiche, selezionare **Save** (Salva) e quindi **Next** (Avanti).
12. Selezionare **Next** (Avanti). Viene visualizzata la schermata **Pre-Run Check** (Controllo pre-corsa).  
Nell'angolo in basso a sinistra della schermata **Review** (Revisione) sono elencati i percorsi correnti delle cartelle per le ricette, i fogli campioni, i manifesti e i dati di output.
13. Prima di avviare la seduta, il sistema esegue un controllo preliminare di tutti i componenti, dello spazio sul disco e delle connessioni di rete.  
Se alcuni elementi non superano il controllo preliminare, nella schermata viene visualizzato un messaggio con le istruzioni per correggere l'errore.
14. Una volta che tutti gli elementi hanno superato il controllo preliminare, selezionare **Start Run** (Avvia corsa).

15. Al termine viene visualizzato il pulsante **Next** (Avanti). Rivedere i risultati nella schermata **Sequencing** (Sequenziamento) prima di proseguire.

**Nota:** la schermata **Sequencing** (Sequenziamento) è visibile fintanto che non viene selezionato il pulsante **Next** (Avanti). Una volta selezionato il pulsante **Next** (Avanti), non è possibile ritornare alla schermata **Sequencing** (Sequenziamento).

16. Selezionare **Next** (Avanti) per uscire dalla schermata **Sequencing** (Sequenziamento) e procedere al lavaggio "post-corsa".

Si tratta del normale lavaggio dello strumento che viene eseguito tra un sequenziamento e il successivo. Eseguire sempre un lavaggio dello strumento al termine di un sequenziamento. Seguire i comandi del software per caricare i componenti necessari ed eseguire il lavaggio. Il lavaggio "post-corsa" ha una durata di 20 minuti circa. Avviare il lavaggio direttamente, al termine di un sequenziamento. È obbligatorio eseguire un lavaggio dello strumento prima di allestire il sequenziamento successivo.

Prima di passare al "Protocollo: Analisi dei dati", a pagina 12 della 2ª parte, controllare i dati di output del sequenziamento applicando i criteri per il controllo qualità illustrati di seguito.

### **Criteri per il controllo qualità**

- Se i dati di output sono > 3 GB, significa che la quantità di letture è sufficiente.
- Le letture con un punteggio Q-Score > Q30 devono essere > 80%. Il punteggio Q-Score è una previsione delle probabilità di errore nella chiamata delle basi.

Se i dati di output del sequenziamento sono insufficienti, vedere la "Guida alla risoluzione dei problemi" a pagina 44.

# Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni critiche riguardanti la valutazione dello stato della mutazione *BRCA1/2* con il kit *therascreen BRCA1/2* NGS FFPE gDNA. Per le informazioni sui contatti, vedere il retro di copertina o visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Per informazioni sulla risoluzione dei problemi relativi ad altri kit, consultare i manuali dei kit corrispondenti.

Per informazioni sulla risoluzione dei problemi relativi allo strumento Illumina MiSeqDx e al software associato, compresi Biomedical Genomics Workbench e *BRCA 1/2 CE-IVD* Workflow, consultare le guide utente e i manuali corrispondenti.

## Commenti e suggerimenti

---

### Scarsa resa del DNA target

- a) Controllare la concentrazione del gDNA

Si consiglia di utilizzare un fluorimetro per la quantificazione del gDNA dal materiale FFPE di partenza.

La concentrazione del gDNA deve essere  $> 2,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$  per ottenere una quantità di campione sufficiente per gli esperimenti successivi. Il kit è ottimizzato per 10 ng di gDNA per ogni reazione PCR target (in totale 40 ng).

## Commenti e suggerimenti

---

- b) Controllare la concentrazione del controllo positivo ottenuta dopo la target-PCR (T-PCR), la creazione del pool e la purificazione
- Se la concentrazione del controllo positivo NA12878 è inferiore a 20 ng/μl, potrebbe essersi verificato un errore durante la T-PCR o durante i passaggi di creazione del pool e purificazione.
- Ripetere la T-PCR per tutti i campioni.
- c) Controllare la concentrazione dei campioni dopo la T-PCR, la creazione del pool e la purificazione
- Una concentrazione del campione al di sotto del criterio per il controllo qualità (4 ng/μl) potrebbe essere indicativa di un DNA degradato.
- Ripetere l'estrazione del DNA dal campione che ha generato l'errore.

### Scarsa resa della libreria

- a) Controllare le rese della T-PCR
- Dopo la T-PCR e prima di procedere con la preparazione della libreria, le concentrazioni del controllo positivo e dei campioni devono essere rispettivamente > 20 ng/μl e > 4 ng/μl.
- Se la concentrazione del controllo positivo è troppo bassa, ripetere la T-PCR per tutti i campioni.
  - Se la concentrazione di un campione è troppo bassa, ripetere l'estrazione del DNA campione.

## Commenti e suggerimenti

---

- b) Controllare la concentrazione del controllo positivo dopo i passaggi di preparazione della libreria e dimensionamento
- Quantificare le librerie purificate e dimensionate utilizzando un kit di quantificazione delle librerie mediante qPCR che sia compatibile con il sistema Illumina. Ripetere la quantificazione se i criteri per il controllo qualità non sono soddisfatti.
- Se la concentrazione del controllo positivo NA12878 è inferiore a 120 nM, potrebbe essersi verificato un errore durante i passaggi di preparazione della libreria, dimensionamento, amplificazione PCR o purificazione PCR.
- Ripetere l'allestimento della libreria dal gDNA per tutti i campioni.
- c) Controllare la concentrazione dei campioni dopo i passaggi di preparazione della libreria e dimensionamento
- Quantificare le librerie purificate e dimensionate utilizzando un kit di quantificazione delle librerie mediante qPCR che sia compatibile con il sistema Illumina. Prestare attenzione ai criteri per il controllo qualità della qPCR descritti nel protocollo.
- Se la concentrazione di un campione è inferiore a 80 nM, potrebbe essersi verificato un errore durante i passaggi di preparazione della libreria, dimensionamento, amplificazione PCR o purificazione PCR.
- Ripetere l'allestimento della libreria dal gDNA per il campione interessato.

## Commenti e suggerimenti

---

### Scarso output di dati di sequenziamento (letture totali < 3 GB)

Controllare la quantità di materiale della libreria che è stato aggiunto alla cartuccia di sequenziamento Illumina

Per evitare errori di lettura di sezioni della regione *BRCA1/2*, sono consigliati 3 GB di dati di sequenziamento in totale. Se il criterio di qualità (3 GB) non è soddisfatto, ripetere il protocollo a partire dal passaggio di quantificazione della libreria.

Controllare le immagini delle celle a flusso Illumina seguendo le istruzioni del produttore.

- Se la libreria è sovraccarica (densità dei cluster saturata), ridurre il numero di librerie in pool aggiunte alla cartuccia.
- Se la densità dei cluster è bassa, aumentare il numero di librerie in pool aggiunte alla cartuccia.

### Bassa specificità del sequenziamento (% di letture allineate alla regione target *BRCA1/2*)

Controllare le dimensioni medie delle librerie dimensionate e purificate

Se il criterio di qualità della specificità (80%) non è soddisfatto, valutare la qualità della purificazione analizzando le dimensioni dei frammenti della libreria. La dimensione media di un amplicone è di 280 bp.

Riavviare il protocollo dalla T-PCR.

## Commenti e suggerimenti

---

### Bassa copertura delle letture

Controllare la copertura minima per amplicone

Se il criterio di qualità della copertura (200x) non è soddisfatto, si consiglia di:

- Verificare che le 4 reazioni PCR target siano state unite in pool con volumi equivalenti.
- Verificare l'omogeneità delle letture per quanto riguarda il numero delle letture ottenute per ciascuno dei 10 campioni più il controllo positivo.

### Contaminazione del controllo senza template (NTC)

a) Controllare il controllo NTC dopo la T-PCR

Se viene rilevato un campione nel controllo NTC, potrebbe essersi verificata una contaminazione durante la T-PCR o durante i passaggi di creazione del pool di campioni e di purificazione.

Ripetere la T-PCR.

b) Controllare la concentrazione del controllo NTC dopo i passaggi di preparazione della libreria e dimensionamento

Se la concentrazione del controllo NTC è superiore a 1 nM, potrebbe essersi verificata una contaminazione durante i passaggi di preparazione della libreria, dimensionamento, amplificazione PCR o purificazione PCR.

Ripetere la T-PCR.



---

## Riferimenti bibliografici










1. WHO, IARC GLOBOCAN. (2012) Cancer incidence and mortality worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr/>.
2. Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. (2013) Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **63**, 11–30.
3. Kanchi, K.L. et al. (2014) Integrated analysis of germline and somatic variants in ovarian cancer. *Nature Communications* **5**, 3156.
4. Hennessy, B.T. et al. (2010) Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in OvCa. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3570.
5. Gilks, C.B. and Prat, J. (2009) Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. *Hum. Pathol.* **40**, 1213.
6. Kurman, R.J. and Shih, Ie M. (2010) The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer. A proposed unifying theory. *Am. J. Surg. Pathol.* **34**, 433.
7. Pal, T. et al. (2005) BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer* **104**, 2807.
8. Risch, H.A. et al. (2001) Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with OvCa. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 700.
9. Cancer Genome Atlas Research Network. (2011) Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**, 609.

10. Foley, O.W., Rauh-hain, J.A. and Del Carmen, M.G. (2013) Recurrent epithelial OvCa: an update on treatment. *Oncology* **27**, 288, 298. Review.
11. Yap, T.A., Carden, C.P. and Kaye, S.B. (2009) Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 167.
12. Audeh, M.W. et al. (2010) Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent OvCa: a proof-of-concept trial. *Lancet* **376**, 245.
13. Alsop, K. et al. (2012) BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with OvCa: a report from the Australian OvCa Study Group. *J. Clin. Oncol.* **30**, 2654.
14. Ledermann, J. et al. (2014) Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous OvCa: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **15**, 852.
15. Burgess, M. and Puhalla, S. (2014) BRCA 1/2-mutation related and sporadic breast and OvCas: more alike than different. *Front. Oncol.* **4**, 19.
16. Marth, C. et al. (2015) AGO Austria recommendations for genetic testing of patients with OvCa. *Wien Klin. Wochenschr.* **127**, 652.
17. Casey, G. (1997) The BRCA1 and BRCA2 breast cancer genes. *Curr. Opin. Oncol.* **9**, 88.
18. Prat, J. (2012) Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch.* **460**, 237.

- 
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2006) *Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods: Approved Guideline*, 1st ed. CLSI Document MM13-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
  20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012). *Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

# Simboli

I seguenti simboli potrebbero comparire sulle confezioni e sulle etichette:

Simbolo	Definizione del simbolo
	Numero di catalogo
	Produttore
	Numero di materiale
Rn	"R" indica la revisione del manuale e "n" il numero della revisione
	Codice del lotto
	Global Trade Item Number
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Marchio CE per la Conformità Europea
	Utilizzare entro
 <N>	Contenuto sufficiente per N reazioni

**Simbolo****Definizione del simbolo**

---



Limiti di temperatura



Componenti (ad esempio un elenco di tutto ciò che è incluso)



Contiene (contenuto)



Numero (ad esempio fiale, flaconi)



Attenzione



Fare riferimento alle informazioni fornite nel manuale



Tenere al riparo dalla luce

# Informazioni per gli ordini

Le informazioni necessarie per ordinare ulteriori prodotti e reagenti sono riportate nella Tabella 1 a pagina 16.

Prodotto	Indice generale	N° cat.
<i>therascreen</i> BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit CE (20)	Per 20 reazioni: per l'identificazione delle varianti nei geni <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> con la piattaforma Illumina MiSeqDx; BRCA Primer Mix 1, BRCA Primer Mix 2, BRCA Primer Mix 3, BRCA Primer Mix 4, HotStarTaq DNA polimerasi, GR NGS Panel 5x PCR Buffer V2, acqua priva di nucleasi come controllo NTC	875011

Per le informazioni aggiornate sulla licenza e le clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, consultare il manuale del kit QIAGEN specifico o il manuale utente. I manuali dei kit QIAGEN possono essere scaricati dal sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) o richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al distributore locale.

---

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

---

Pagina lasciata vuota intenzionalmente



---

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Questo prodotto è destinato all'uso diagnostico in vitro. I prodotti QIAGEN non possono essere rivenduti, modificati per la rivendita o impiegati per la realizzazione di prodotti commerciali senza il consenso scritto di QIAGEN.

Le informazioni contenute in questo documento sono soggette a modifiche senza preavviso. QIAGEN declina qualsiasi responsabilità per eventuali errori contenuti in questo documento. Questo documento è considerato completo e accurato al momento della pubblicazione. In nessun caso QIAGEN potrà essere ritenuta responsabile di danni accidentali, particolari, multipli o secondari in relazione all'impiego di questo documento o derivanti da quest'ultimo.

I prodotti QIAGEN sono garantiti conformi alle specifiche indicate. L'unico obbligo di QIAGEN – e l'unico rimedio a cui ha diritto il cliente – è la sostituzione gratuita dei prodotti in caso gli stessi non offrano le prestazioni richieste.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, HotStarTaq®, *therascreen*® (Gruppo QIAGEN); AMD® (Advanced Micro Devices, Inc.); ATI™ (ATI Technologies); Eppendorf® (Eppendorf AG); Windows®, Windows Vista® (Microsoft Corporation); Fedora®, Red Hat® (Red Hat, Inc.); Illumina®, MiSeqDx™ (Illumina, Inc.); Intel® (Intel Corporation); Mac OS® (Apple Computer, Inc.); MASTR™ (Multiplicom N.V.); NVIDIA® (NVIDIA Corporation); OpenGL® (Gruppo Khronos); SUSE® (SUSE PLC). I marchi registrati, i marchi di fabbrica ecc. utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, non devono essere considerati non protetti dalla legge.

#### **Contratto di licenza limitata per il kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA**

L'utilizzo di questo prodotto comporta per l'acquirente o l'utente del prodotto l'accettazione dei seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al relativo manuale e soltanto con i componenti contenuti nel rispettivo Kit. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo kit con qualsiasi componente non incluso in questo kit, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Alcuni protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre nessuna garanzia in merito alla violazione di eventuali diritti di terzi.
2. Al di là delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce nessuna garanzia che questo kit e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscono violazione dei diritti di terzi.
3. Questo kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN nega espressamente qualsiasi altra licenza, esplicita o implicita, ad eccezione delle licenze espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo kit e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-2196-002 1103448 157014156 02/2017

© 2017 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

