

Inserto della confezione per TruSight Cystic Fibrosis

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

N. di catalogo 20036925: 1-4 corse, fino a 96 campioni per kit

Descrizione del prodotto

TruSight Cystic Fibrosis Library Prep™ è un kit di preparazione delle librerie che supporta il saggio TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay™ e il saggio TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay™.

Uso previsto del saggio TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant

Il saggio TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant (in precedenza chiamato MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant) è un sistema diagnostico *in vitro* usato per rilevare simultaneamente 139 mutazioni e varianti clinicamente rilevanti che causano la fibrosi cistica del gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, CFTR) in DNA genomico isolato da campioni di sangue intero periferico umano. Le varianti includono quelle raccomandate nel 2004 dall'American College of Medical Genetics (ACMG)¹ e nel 2011 dall'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG).² Il test è previsto per lo screening dei portatori negli adulti in età riproduttiva, per test diagnostici di conferma di neonati e bambini e come test iniziale per contribuire alla diagnosi in individui con sospetta fibrosi cistica. I risultati di questo test sono previsti per essere interpretati da un esperto certificato in genetica molecolare o equivalente e dovrebbero essere usati assieme ad altre informazioni di laboratorio e cliniche disponibili.

Questo test non è indicato per l'uso nello screening neonatale, in test diagnostici prenatali, in test preimpianto o per fini diagnostici indipendenti.

Il test è previsto per l'uso con lo strumento MiSeqDx Illumina.

Uso previsto del saggio TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Il saggio TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing (precedentemente chiamato MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina) è un sistema diagnostico *in vitro* per il risequenziamento delle regioni codificanti la proteina e i limiti introne/esone del gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR) nel DNA genomico isolato da campioni di sangue intero periferico umano raccolti in K₂EDTA. Il test rileva le varianti di singolo nucleotide e Indel piccole nella regione sequenziata e riporta inoltre due mutazioni introniche profonde e due delezioni ampie. Il test è previsto per l'uso con lo strumento MiSeqDx Illumina.

Questo test è previsto per contribuire alla diagnosi in individui con sospetta fibrosi cistica (CF). Questo saggio è più appropriato quando il paziente presenta una fibrosi cistica atipica o non classica o quando altri pannelli di mutazioni non sono riusciti a identificare entrambe le mutazioni causanti la malattia. I risultati del test devono essere interpretati da un gruppo di genetisti molecolari certificati o da un esperto equivalente e devono essere usati assieme ad altre informazioni inclusi sintomi clinici, altri test diagnostici e anamnesi familiare.

Questo test non è indicato per fini diagnostici indipendenti, diagnosi prenatale, analisi pre-impianto, test preimpianto, screening del portatore, screening neonatale o screening della popolazione.

Informazioni su Cystic Fibrosis

Descrizione clinica

La fibrosi cistica (CF) è uno dei più comuni disordini genetici del mondo occidentale e il più comune disordine recessivo autosomico potenzialmente letale nella popolazione bianca non ispanica.³⁻⁷ La fibrosi cistica incide sulla viscosità delle secrezioni mucose e incide sugli epitelii del tratto respiratorio, sul pancreas, sull'intestino, sul sistema epatobiliare, sul tratto genitale maschile e sulle ghiandole sudorifere, risultando in un disordine multisistemico e multiorgano⁴⁻⁶ dove i polmoni sono il principale sistema di organi associati con la morbidità e la mortalità.⁸ In molti casi, la riduzione della nutrizione è un presagio della progressione della malattia polmonare nella fibrosi cistica. Gli attuali sforzi interventistici mirano alla diagnosi precoce mediante lo screening neonatale,⁷ facilitando quindi l'accesso tempestivo a servizi medici vitali e consentendo l'esito migliore possibile per gli individui con il disordine.^{4,7} Sebbene la sopravvivenza sia diversa tra i sessi, con una sopravvivenza mediana riportata superiore per gli uomini rispetto alle donne, la sopravvivenza mediana complessiva è di 38,3 anni negli Stati Uniti.⁸

Varianti del gene CFTR e incidenza

Il gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR) identificato nel 1989 si trova sul braccio lungo del cromosoma 7 e contiene 27 esoni codificanti su 230 kb.⁴ Un mRNA su 6,5 kb prodotto dall'allele normale codifica CFTR, una proteina di membrana integrale composta da 1.490 amminoacidi che funziona come un canale regolato del cloro nelle cellule epiteliali di più organi.^{4,5} Attualmente sono descritte più di 1.900 varianti di CFTR e la maggior parte sono mutazioni puntiformi.⁹ La più comune variante CFTR è l'allele F508del,⁵ che rappresenta quasi il 70% di tutte le varianti CFTR.³ Tuttavia, altre varianti CFTR comuni risultano spesso in un fenotipo della fibrosi cistica e altri disturbi legati a CFTR.³⁻⁵

La fibrosi cistica ha un'incidenza della malattia stimata in uno su 2.000-4.000 nati vivi e una prevalenza di circa 30.000 individui nella popolazione statunitense.⁴ Si verifica in tutte le etnie e popolazioni razziali, a frequenze diverse: uno su 3.000 caucasici, uno su 9.200 ispano-americani, uno su 10.900 nativi americani, uno su 15.000 afro-americani e uno su 31.000 asiatici-americani.^{4,6} La **Tabella 1** mostra le stime attuali sulla frequenza dei portatori della mutazione di CFTR per etnia negli Stati Uniti, in base a una coorte di 364.890 individui sottoposti al test del portatore senza anamnesi familiare di fibrosi cistica.

Tabella 1 Frequenza generale dei portatori della mutazione della fibrosi cistica in diversi gruppi etnici negli Stati Uniti¹⁰

Gruppo etnico	Frequenza dei portatori osservata
Afroamericano	1 in 84
Ebreo ashkenazita	1 in 29
Asiatica	1 in 242
Caucasico	1 in 28
Ispanico	1 in 59
Ebreo	1 in 32
Medio orientale	1 in 91
Nativo americano	1 in 70
Sud asiatico	1 in 118
Altra etnia	1 in 111
Altra etnia: > 1 etnia	1 in 34
Altra etnia: americano parte africano	1 in 56
Altra etnia: parte caucasico	1 in 32
Altra etnia: parte ispanico	1 in 51
Non fornito	1 in 37
Tutti gli individui	1 in 38

Riepilogo e spiegazione del saggio Cystic Fibrosis 139-Variant

Panoramica del progetto CFTR2

Il progetto CFTR2 è un'iniziativa internazionale guidata da un team di ricercatori e medici e supportata dal National Institute of Health e dalla U.S. Cystic Fibrosis Foundation statunitense.^{11,12} CFTR2 ha lo scopo di fornire informazioni funzionali e cliniche complete da parte di esperti sulle varianti CFTR. In uno sforzo per convalidare clinicamente tutte le varianti CF con frequenze alleliche di 0,01% e di percentuali superiori, 25 archivi e cliniche CF da tutto il mondo¹³ hanno unito le proprie risorse con lo scopo di confrontare le informazioni cliniche di più di 39.000 pazienti affetti da fibrosi cistica con circa 1.900 varianti del gene CF che sono stati registrati negli anni nel database CFTR1 dell'Hospital for Sick Children di Toronto.^{11,13} Le caratteristiche cliniche, come la concentrazione di cloro nel sudore, la funzione polmonare (FEV1% prevista) e lo stato di salute del pancreas, sono state analizzate assieme alle informazioni del genotipo CFTR. L'approccio sistematico di analisi simultanea di queste varianti da una prospettiva clinica, funzionale e genetica ha prodotto 134 varianti univoche causanti la fibrosi cistica a 129 posizioni genomiche univoche (poiché per cinque posizioni, due cambiamenti del nucleotide appaiono sulla stessa posizione) contenute nel database CFTR2 (aggiornato ad agosto 2013). L'uso di un pannello comprendente tutte queste varianti si prevede che equivalga al 95,4% degli alleli che causano la fibrosi cistica e, mediante il rilevamento di entrambi gli alleli, aumenta a circa il 91% l'identificazione di coppie a rischio rispetto al 72% usando il pannello di 23 varianti raccomandato dall'ACMG (American College of Medical Genetics).

Varianti del gene CFTR nel pannello

Le varianti riportate dal saggio Cystic Fibrosis 139-Variant sono state appositamente scelte perché rappresentano il gruppo completo di varianti convalidate clinicamente e classificate come causanti la fibrosi cistica nel database CFTR2 presso la Johns Hopkins University, un prodotto dell'iniziativa di CFTR2 (Clinical and Functional Translation of CFTR).

Il saggio testa: 134 varianti che causano la fibrosi cistica, una variante del pannello raccomandata dall'ACMG (R117H, classificata come mutazione di varie conseguenze cliniche, MVCC, da CFTR2), una variante modificante riportata condizionatamente (PolyTG/PolyT) e tre varianti benigne riportate condizionatamente (I506V, I507V, F508C)¹⁴ per un totale di 139 varianti riportate.

Le 134 varianti che causano la fibrosi cistica corrispondono a 129 varianti che causano la fibrosi cistica contenute nel database CFTR2. Il database CFTR2 include cinque varianti che causano la fibrosi cistica per le quali lo stesso cambiamento nel livello della proteina può verificarsi da due cambiamenti distinti del nucleotide [ad es., S466X(C>A) e S466X(C>G)]. Queste cinque varianti sono elencate in base al codone di aminoacido nel database CFTR2 (ad es., S466X) mentre il saggio riporta ciascuna singola variante [ad es., S466X(C>A) e S466X(C>G)]. L'elenco delle 139 varianti riportate dal saggio Cystic Fibrosis 139-Variant sono fornite nella **Tabella 2**. Grassetto = ACMG-23; Corsivo = riportata condizionatamente.

Tabella 2 Riepilogo delle varianti per il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant

[Le varianti sono elencate in base all'ordine delle coordinate genomiche; il cambiamento del livello del nucleotide associato per ciascuna variante è indicato in parentesi].

M1V (c.1A>G)	T338I (c.1013C>T)	R553X (c.1657C>T)	3272-26A>G (c.3140-26A>G)
CFTRdele2,3 (c.54-5940_273+10250del21kb)	S341P (c.1021T>C)	A559T (c.1675G>A)	L1065P (c.3194T>C)
Q39X (c.115C>T)	1154insTC (c.1022_1023insTC)	R560T (c.1679G>C)	R1066C (c.3196C>T)
E60X (c.178G>T)	R347H (c.1040G>A)	R560K (c.1679G>A)	R1066H (c.3197G>A)
P67L (c.200C>T)	R347P (c.1040G>C)	1811+1.6kbA>G (c.1679+1.6kbA>G)	L1077P (c.3230T>C)
R75X (c.223C>T)	R352Q (c.1055G>A)	1812-1G>A (c.1680-1G>A)	W1089X (c.3266G>A)
G85E (c.254G>A)	1213delT (c.1081delT)	E585X (c.1753G>T)	Y1092X(C>A) (c.3276C>A)
394delTT (c.262_263delTT)	1248+1G>A (c.1116+1G>A)	1898+1G>A (c.1766+1G>A)	Y1092X(C>G) (c.3276C>G)
405+1G>A (c.273+1G>A)	1259insA (c.1127_1128insA)	1898+3A>G (c.1766+3A>G)	M1101K (c.3302T>A)
406-1G>A (c.274-1G>A)	W401X(c.1202G>A)	2143delT (c.2012delT)	E1104X (c.3310G>T)
E92X (c.274G>T)	W401X(c.1203G>A)	2183AA >G (c.2051_2052delAAinsG)	R1158X (c.3472C>T)
E92K (c.274G>A)	1341+1G>A (c.1209+1G>A)	2184delA (c.2052delA)	R1162X (c.3484C>T)
Q98X (c.292C>T)	1461ins4 (c.1329_1330insAGAT)	2184insA (c.2052_2053insA)	3659delC (c.3528delC)
457TAT>G (c.325_327delTATinsG)	A455E (c.1364C>A)	R709X (c.2125C>T)	S1196X (c.3587C>G)
D110H (c.328G>C)	1525-1G>A (c.1393-1G>A)	K710X (c.2128A>T)	W1204X (c.3611G>A)
R117C (c.349C>T)	S466X (C>A) (c.1397C>A)	2307insA (c.2175_2176insA)	W1204X (c.3612G>A)
R117H (c.350G>A)	S466X (C>G) (c.1397C>G)	L732X (c.2195T>G)	3791delC (c.3659delC)
Y122X (c.366T>A)	L467P (c.1400T>C)	2347delG (c.2215delG)	3849+10kbC>T (c.3717+12191C>T)
574delA (c.442delA)	1548delG (c.1418delG) [†]	R764X (c.2290C>T)	G1244E (c.3731G>A)
621+1G>T (c.489+1G>T)	S489X (c.1466C>A)	2585delT (c.2453delT)	3876delA (c.3744delA)
663delT (c.531delT)	S492F (c.1475C>T)	E822X (c.2464G>T)	S1251N (c.3752G>A)
G178R (c.532G>A)	Q493X (c.1477C>T)	2622+1G>A (c.2490+1G>A)	3905insT (c.3773_3774insT)

711+1G>T (c.579+1G>T)	I507del (c.1519_1521delATC)	E831X (c.2491G>T)	W1282X (c.3846G>A)
711+3A>G (c.579+3A>G)	F508del (c.1521_1523delCTT)	W846X (c.2537G>A)	4005+1G>A (c.3873+1G>A)
711+5G>A (c.579+5G>A)	1677delTA (c.1545_1546delTA)	R851X (c.2551C>T)	4016insT (c.3884_3885insT)
712-1G>T (c.580-1G>T)	V520F (c.1558G>T)	2711delT (c.2583delT)	N1303K (c.3909C>G)
H199Y (c.595C>T)	Q525X (c.1573C>T) [†]	2789+5G>A (c.2657+5G>A)	Q1313X (c.3937C>T)
P205S (c.613C>T)	1717-8G>A (c.1585-8G>A)	Q890X (c.2668C>T)	4209TGTT>AA (c.4077_4080delTGTTinsAA)
L206W (c.617T>G)	1717-1G>A (c.1585-1G>A)	L927P (c.2780T>C)	CFTRdele22,23 (c.3964-78_4242+577del)
Q220X (c.658C>T)	G542X (c.1624G>T)	S945L (c.2834C>T)	4382delA (c.4251delA)
852del22 (c.720_741delAGGGAGAATGATGATGAAGTAC)	S549R(c.1645A>C)	3007delG (c.2875delG)	<i>PolyTG/PolyT</i>
1078delT (c.948delT)	S549N (c.1646G>A)	G970R (c.2908G>C)	<i>I506V (c.1516A>G)</i>
G330X (c.988G>T)	S549R (c.1647T>G)	3120G>A (c.2988G>A)	<i>I507V (c.1519A>G)</i>
R334W (c.1000C>T)	G551D (c.1652G>A)	3120+1G>A (c.2988+1G>A)	<i>F508C (c.1523T>G)</i>
I336K (c.1007T>A)	Q552X (c.1654C>T)	3121-1G>A (c.2989-1G>A)	

[†] Classificato nel database CFTR¹² come una variante che causa la fibrosi cistica, mentre Sosnay¹³ classifica la variante come indeterminata. La classificazione in base al database è più attuale e riflette l'analisi funzionale completa, che non era disponibile all'epoca della pubblicazione di Sosnay.

Riepilogo e spiegazione del saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Progettazione del saggio

Tutte le regioni codificanti le proteine nel gene CFTR, inclusi 10 nt di sequenza intronica fiancheggiante, sono rilevate per tutti gli esoni, fatta eccezione per tre (esoni 7, 10 e 20). Per l'esone 7 e l'esone 10, solo 5 nt di sequenza intronica fiancheggiante sono inclusi all'estremità 5' dell'esone per evitare Indel omopolimeriche prossimali. Per l'esone 20, 30 nt di sequenza intronica fiancheggiante sono inclusi all'estremità 5' dell'esone per consentire di rilevare la mutazione 3272-26A>G. Inoltre il saggio rileva circa 100 nt di sequenza intronica fiancheggiante le regioni non tradotte (UTR) 5' e 3', due profonde mutazioni introniche (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T), due ampie delezioni (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23) e la regione PolyTG/PolyT. La copertura completa del saggio è mostrata nelle posizioni delle coordinate genomiche elencate nella [Tabella 3](#).



NOTA:

Esistono delle limitazioni per il rilevamento delle delezioni in determinate posizioni genomiche nelle regioni sequenziate di questo saggio (vedere [Limitazioni della procedura del saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing a pagina 9](#)).

Tabella 3 Copertura delle coordinate genomiche nel saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

	Avvio della coordinata genomica hg19 (cromosoma 7)	Arresto della coordinata genomica hg19 (cromosoma 7)	Lunghezza (coppia di basi)
CFTR_Esone 1	117120041	117120211	171
CFTR_Esone 2	117144297	117144427	131
CFTR_Esone 3	117149078	117149206	129
CFTR_Esone 4	117170943	117171178	236
CFTR_Esone 5	117174320	117174429	110
CFTR_Esone 6	117175292	117175475	184
CFTR_Esone 7 [^]	117176597	117176737	141
CFTR_Esone 8	117180144	117180410	267
CFTR_Esone 9	117182060	117182172	113
CFTR_Esone 10 [^]	117188690	117188887	198
CFTR_Esone 11	117199508	117199719	212
CFTR_Esone 12	117227783	117227897	115
CFTR_Introne 12 [*]	117229516	117229526	11
CFTR_Esone 13	117230397	117230503	107
CFTR_Esone 14	117231978	117232721	744
CFTR_Esone 15	117234974	117235122	149
CFTR_Esone 16	117242870	117242927	58
CFTR_Esone 17	117243576	117243846	271
CFTR_Esone 18	117246718	117246817	100
CFTR_Esone 19	117250563	117250733	171
CFTR_Esone 20 [#]	117251605	117251872	268
CFTR_Esone 21	117254657	117254777	121
CFTR_Esone 22	117267566	117267834	269
CFTR_Introne 22 [*]	117280010	117280020	11
CFTR_Esone 23	117282482	117282657	176
CFTR_Esone 24	117292886	117292995	110
CFTR_Esone 25	117304732	117304924	193
CFTR_Esone 26	117305503	117305628	126
CFTR_Esone 27	117306952	117307262	311
Basi totali			5203^{**}

[^] Per l'esone 7 e l'esone 10, solo 5 nt di sequenza intronica fiancheggiante sono inclusi a valle dell'esone per evitare allungamenti omopolimerici in queste regioni. Nel caso dell'esone 10, questa è la regione PolyT/PolyTG nell'introne 9. Questa regione viene trattata in modo particolare e separatamente.

^{*} Per le mutazioni introniche profonde, sono inclusi anche 5 nucleotidi che fianleggiano le varianti SNV su entrambi i lati.

[#] Per l'esone 20, 30 nt di sequenza intronica fiancheggiate sono inclusi all'estremità 5' dell'esone per permettere il rilevamento della mutazione 3272-26A>G.

^{**} Con le due ampie delezioni e le regioni PolyTG/PolyT, il numero totale di posizioni/regioni è 5.206.

Principi della procedura

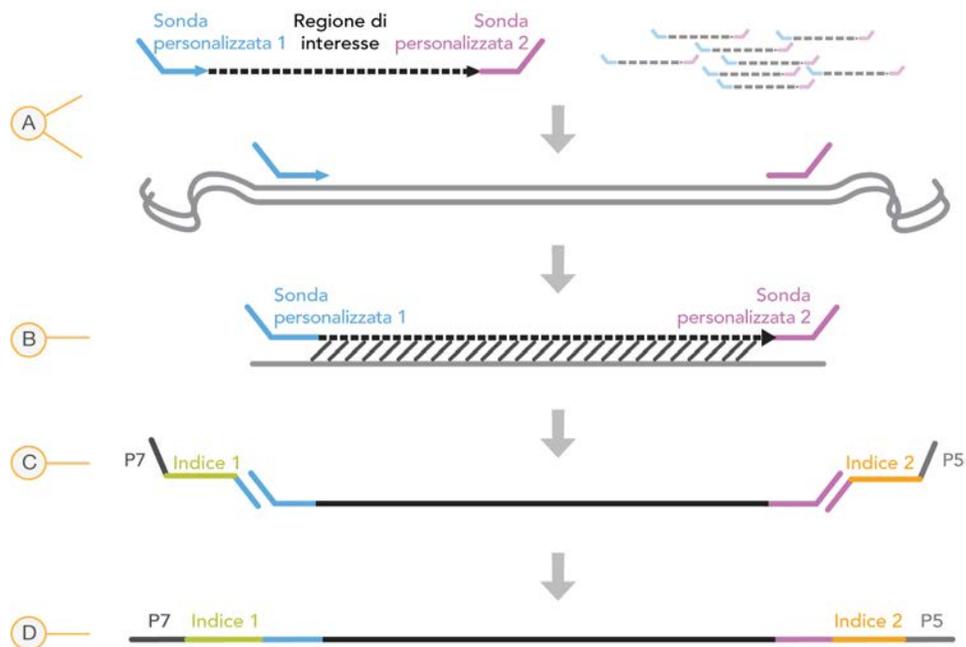
La preparazione delle librerie TruSight Cystic Fibrosis è prevista per la preparazione manuale delle librerie utilizzate per il sequenziamento del DNA ottenuto da campioni di sangue intero. La preparazione delle librerie consiste di quattro fasi principali: ibridazione, estensione-ligazione, amplificazione mediante PCR e normalizzazione della libreria.



NOTA

Le procedure per la preparazione delle librerie per il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant e il saggio Clinical Sequencing sono identiche.

Preparazione delle librerie



- A Ibridazione:** la prima fase consiste nell'ibridare un raggruppamento in pool di oligonucleotidi a monte e a valle specifici per il gene della fibrosi cistica per il campione di DNA genomico. Al termine di questo processo, una procedura di lavaggio in tre fasi, con un filtro in grado di selezionare le dimensioni, rimuove gli oligonucleotidi non legati dal DNA genomico.
- B Estensione-ligazione:** la seconda fase, estensione-ligazione, collega gli oligonucleotidi ibridati a monte e a valle. Una DNA polimerasi si estende dagli oligonucleotidi a monte fino alla regione target e successivamente si lega all'estremità 5' dell'oligonucleotide a valle mediante una DNA ligasi. Il risultato consiste nella formazione di prodotti contenenti gli oligonucleotidi specifici della fibrosi cistica fiancheggiati da sequenze necessarie per l'amplificazione.
- C Amplificazione mediante PCR:** la terza fase consiste nell'amplificazione dei prodotti dell'estensione-ligazione mediante adattatori indice che aggiungono sequenze d'indice per i campioni in multiplex, oltre a comuni adattatori necessari per la generazione dei cluster su MiSeqDx. Al termine di questo processo, una procedura di pulizia della PCR purifica i prodotti della PCR (indicati come libreria).

- D **Normalizzazione della libreria:** la fase finale, la normalizzazione della libreria, consiste nel normalizzare la quantità di ciascuna libreria onde garantire una rappresentazione più equilibrata nel raggruppamento in pool finale di librerie. Al termine di questo processo, il raggruppamento in pool di librerie viene caricato su MiSeqDx per il sequenziamento mediante la chimica SBS.

Sequenziamento

La chimica SBS utilizza un metodo che fa uso di terminatori reversibili per rilevare le singole basi nucleotidiche man mano che vengono incorporate in filamenti di DNA crescenti. Durante ciascun ciclo di sequenziamento, alla catena dell'acido nucleico viene aggiunto un solo deossinucleotide trifosfato (Deoxynucleotide Triphosphate, dNTP) marcato in fluorescenza. Il nucleotide marcato funge da terminatore per la polimerizzazione, così, dopo ogni incorporazione di dNTP, il colorante fluorescente viene sottoposto a imaging al fine di identificare la base e quindi sottoposto a scissione enzimatica per consentire l'incorporazione del nucleotide successivo. Poiché tutti e quattro i dNTP legati al terminatore reversibile (A, G, T, C) sono presenti come molecole singole e separate, la competizione naturale riduce al minimo le distorsioni dovute all'incorporazione. Le identificazioni delle basi vengono effettuate direttamente dalle misurazioni dell'intensità del segnale durante ciascun ciclo di sequenziamento. Il risultato è un sequenziamento base per base.

Analisi dei dati

La prima fase dell'analisi dei dati è chiamata analisi primaria. Questo processo viene eseguito dal software Real Time Analysis (RTA) che genera le identificazioni delle basi e assegna i punteggi qualitativi. Nella fase successiva, chiamata analisi secondaria, le identificazioni delle basi generate durante l'analisi primaria vengono elaborate per generare informazioni su ogni campione. Il software Local Run Manager esegue l'analisi secondaria che include demultiplex, generazione di file FASTQ, allineamento, identificazione delle varianti e generazione di file in formato VCF che contengono informazioni sulle varianti individuate in determinate posizioni nel genoma di riferimento.

- ▶ **Demultiplex:** se la corsa contiene più campioni e presenta letture indici, questa rappresenta la prima fase dell'analisi secondaria. Il demultiplex separa i dati da un raggruppamento in pool di campioni in base agli indici sequenza univoci che sono stati aggiunti durante la fase di amplificazione mediante PCR.
- ▶ **Generazione di file FASTQ:** dopo il demultiplex, Local Run Manager genera i file di analisi intermedia in formato FASTQ, un formato di testo utilizzato per rappresentare le sequenze. I file FASTQ contengono le letture di ogni campione e i punteggi qualitativi, fatta eccezione per le letture dei cluster che non hanno attraversato il filtro.
- ▶ **Allineamento:** mediante l'allineamento è possibile confrontare le sequenze rispetto a un riferimento, al fine di identificare una relazione fra le sequenze e assegnare un punteggio in base a regioni di similarità. Le letture allineate vengono scritte su file in formato BAM. Per il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant e il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing l'allineamento locale delle sequenze viene eseguito con un algoritmo di Smith-Waterman a bande per determinare le regioni simili tra le sequenze.
- ▶ **Identificazione delle varianti:** durante questa fase vengono registrate le varianti di singolo nucleotide (Single Nucleotide Variant, SNV), le inserzioni e delezioni (Indel) e altre varianti strutturali in un file di testo standardizzato chiamato TruSightCF139VariantAssay.txt per il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant oppure TruSightCFClinicalSequencingAssay.txt per il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing.

Per maggiori informazioni sul flusso di lavoro dell'analisi, vedere le guide relative ai software di analisi installati su MiSeqDx. Per la *Guida al flusso di lavoro del modulo di analisi CF 139-Variant 2.0 per Local Run Manager*, vedere (documento n. 1000000100945). Per *Guida al flusso di lavoro del modulo di analisi CF Clinical Seq 2.0 per Local Run Manager*, vedere (documento n. 1000000100946).

Limitazioni della procedura del saggio Cystic Fibrosis 139-Variant

- ▶ Per uso diagnostico *in vitro*.
- ▶ I risultati ottenuti utilizzando il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant devono essere usati e interpretati nel contesto di una valutazione clinica completa.
- ▶ Il saggio è progettato per identificare uno specifico sottogruppo di varianti note nel gene CFTR, ma non include tutte le varianti identificate nel gene CFTR. Nello specifico, il saggio riporta solo i cambiamenti del livello degli amminoacidi se questi sono associati con i cambiamenti del nucleotide come elencato nella [Tabella 2](#). Mentre altri cambiamenti del livello di nucleotidi possono portare agli stessi cambiamenti del livello degli amminoacidi, questi non verranno riportati dal saggio. Quindi, se una variante non viene identificata non garantisce che altre varianti del gene CFTR non siano presenti nei campioni analizzati.
- ▶ La frequenza delle varianti identificate mediante questo saggio varia fra le diverse popolazioni.
- ▶ Come per qualsiasi saggio basato su ibridazione, i polimorfismi o le varianti latenti nelle regioni che legano gli oligonucleotidi possono incidere sugli alleli sondati e, di conseguenza, sulle identificazioni effettuate.
- ▶ Il saggio non può determinare se l'orientamento della variante PolyTG/PolyT si trova in cis/trans sulla variante R117H. Per i pazienti con una variante R117H, vengono eseguiti ulteriori test per determinare se una variante PolyTG/PolyT, che può incidere sul fenotipo clinico [ad. es., 12-13(TG) o 5T] è in orientamento cis/trans sulla variante R117H.
- ▶ PolyTG/PolyT sono regioni omopolimeriche note per essere difficili da interpretare con saggi basati sulle sequenze dovuti a scivolamento della polimerasi. È stata osservata una percentuale di mancata identificazione dello 0,9% (4/448) per i risultati PolyTG/PolyT dimostrando una discrepanza ± 1 TG quando confrontato con il sequenziamento bidirezionale Sanger nella [Tabella 16](#).

Limitazioni della procedura del saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

- ▶ Per uso diagnostico *in vitro*.
- ▶ I risultati ottenuti con il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing devono essere utilizzati e interpretati nel contesto di una valutazione clinica completa.
- ▶ Il saggio sequenzia le regioni seguenti nel gene CFTR:
 - ▶ Tutte le regioni codificanti le proteine nel gene CFTR su 27 esoni.
 - ▶ Tra 5 e 10 basi di sequenze introniche fiancheggianti.
 - ▶ 100 nucleotidi di sequenza intronica alle regioni 5' e 3' non tradotte.
 - ▶ Due mutazioni introniche profonde (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T).
 - ▶ La sequenza PolyTG/PolyT si trova nell'introne 9.
 - ▶ Un totale di 5.206 posizioni/regioni delle possibili 188.702 coppie di basi nel gene.
- ▶ Il saggio è progettato per sequenziare le regioni codificanti le proteine e i confini introne/esone del gene CFTR e non comprende tutte le regioni introniche e le delezioni ampie. Pertanto, un risultato complessivo "wild type" non garantisce che nei campioni analizzati non siano presenti altre varianti/mutazioni del regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR).
 - ▶ Il saggio è progettato per rilevare due delezioni ampie specifiche: CFTRdele2,3 e CFTRdele22,23. Il saggio non può rilevare o riportare altre delezioni ampie. Questo saggio è convalidato solo per inserzioni e delezioni fino a e includendo 3 bp in dimensione.
- ▶ Tutte le inserzioni/delezioni sono allineate sulla sinistra nelle regioni omopolimeriche, mentre sono allineate sulla destra in base alla nomenclatura HGVS. Ad esempio, la variante c.313delA (con contesto di sequenza GAATC) è identificata come una delezione G-ATC, ma la delezione viene riportata in dbSNP come una delezione GA-TC. Un'eccezione è rappresentata dalle 135 variazioni della fibrosi cistica elencate nel database CFTR2 come causanti la malattia (in base alla versione del database delle varianti del 10 Agosto 2012). Tutte le Indel in regioni omopolimeriche entro questo gruppo di variazioni sono riportate come corrispondenti alle varianti previste in base al database CFTR2.¹³

- Il saggio presenta una limitazione nel rilevare delezioni a determinate posizioni genomiche entro le regioni sequenziate. Le coordinate genomiche nelle quali il saggio non può riportare le delezioni sono elencate nella **Tabella 4**. Il saggio non può rilevare le delezioni che includono la base o le basi nella colonna delle limitazioni.

Tabella 4 Coordinate genomiche nelle quali le delezioni non possono essere rilevate

Regione gene CFTR	Coordinate genomiche hg19 (cromosoma 7)
CFTR_Esone1	117120041; 117120211
CFTR_Esone3	117149091
CFTR_Esone4	117170953-117170954*; 117171082
CFTR_Esone5	117174362
CFTR_Esone6	117175417
CFTR_Esone7	117176621
CFTR_Esone8	117180176-117180177*
CFTR_Esone9	117182126
CFTR_Esone10	117188771
CFTR_Esone11	117199544-117199545*; 117199697
CFTR_Esone12	117227802
CFTR_Esone14	117232106-117232107*; 117232466-117232467*; 117232609
CFTR_Esone17	117243705; 117243843
CFTR_Esone18	117246751
CFTR_Esone19	117250688
CFTR_Esone20	117251788
CFTR_Esone22	117267721
CFTR_Esone23	117282597
CFTR_Esone24	117292953
CFTR_Esone25	117304740-117304741*; 117304869
CFTR_Esone26	117305518
CFTR_Esone27	117307178

* Solo le delezioni che comprendono entrambe le basi qui elencate non possono essere rilevate. Ad esempio, in Esone8, solo le delezioni ≥ 2 bp che comprendono le basi a entrambe le coordinate genomiche 117180176 e 117180177 non possono essere rilevate. Una delezione di una base a 117180176 o 117180177 può essere rilevata.

- Se la coordinata interessata elencata nella **Tabella 4** è la base più a sinistra in una regione omopolimerica, una delezione a qualsiasi altra posizione entro l'allungamento omopolimerico non può essere rilevata poiché non può essere distinta da una delezione alla coordinata interessata.
- Il saggio non può rilevare un totale di cinque varianti elencate nel database clinico ClinVar (la versione del database consultata è di dicembre 2014). Queste cinque varianti specifiche sono incluse nella **Tabella 5**. Questa limitazione del saggio non incide su qualsiasi variante elencata nel database della fibrosi cistica CFTR2 (versione del database del 10 Agosto 2012). Non erano disponibili dati della frequenza per le varianti.

Tabella 5 Varianti note non rilevate dal saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

N. variante	ID ClinVar	Regione gene CFTR	Posizione genomica (cromosoma 7)	Nome cDNA (HGVS)	Nome proteina (HGVS)	ID rs
1	RCV000046424	CFTR_Esone3	117149091	c.168delA	p.Glu56Aspfs	rs397508269
2	RCV000046687	CFTR_Esone17	117243703-117243704*	c.2775_2776delTT	p.Leu926Alafs	rs397508433

N. variante	ID ClinVar	Regione gene CFTR	Posizione genomica (cromosoma 7)	Nome cDNA (HGVS)	Nome proteina (HGVS)	ID rs
3	RCV000046688	CFTR_ Esone17	117243705	c.2777delT	p.Leu926Cysfs	rs397508434
4	RCV000046782	CFTR_ Esone19	117250690*	c.3106delA	p.Thr1036Profs	rs397508497
5	RCV000046857	CFTR_ Esone20	117251789*	c.3294delG	p.Trp1098Cysfs	rs397508534

* In questi casi, le coordinate interessate rientrano in una regione omopolimerica.

- ▶ La frequenza delle varianti identificate mediante questo saggio varia fra le diverse popolazioni. Con questo saggio non è possibile convalidare tutte le combinazioni delle varianti che possono essere rilevate nel gene CFTR. Si raccomanda all'utente di confermare varianti nuove e rare mediante un metodo di riferimento convalidato.
- ▶ Come per qualsiasi saggio basato su ibridazione, polimorfismi, mutazioni, inserzioni o delezioni latenti nelle regioni che legano gli oligonucleotidi possono incidere sugli alleli sondati e, di conseguenza, sulle identificazioni effettuate.
- ▶ Per le varianti complesse in cui una delezione e inserzione si verifica nello stesso sito, il saggio può riportarle come due varianti separate in stretta vicinanza. Non viene valutata la determinazione delle fasi (phasing) delle varianti e devono essere prese in considerazione altre soluzioni possibili per il rilevamento della sequenza. Vedere la **Tabella 6** per un esempio di una variante complessa di questo tipo.

Tabella 6 Variante complessa, esempio

Contesto sequenza (riferimento)	GAAGAAATT
Sequenza per la variante osservata	GAAT – – ATT
Variante prevista	Delezione di GAA, Inserzione di T (entrambi cambiamenti sullo stesso cromosoma)
Variante/i riportate dal saggio	SNP (G>T); delezione di AA

- ▶ Se per un campione vengono identificate più di due varianti, si raccomanda di verificare il risultato ripetendo il campione e usando lo strumento MiSeqDx con gDNA estratto fresco per escludere la contaminazione incrociata del campione.



NOTA

Quando vengono rilevate due o più varianti deve essere presa in considerazione la determinazione delle fasi (phasing) per l'aplotipo. Questo saggio non può determinare se le varianti sono in cis/trans rispetto alle altre varianti.

- ▶ Il saggio non può determinare se l'orientamento della variante PolyTG/PolyT si trova in cis/trans rispetto ad altre varianti. Per i pazienti con una variante R117H, devono essere eseguiti ulteriori test per determinare se una variante PolyTG/PolyT, che può incidere sul fenotipo clinico [ad. es., 12-13 (TG) o 5T], è in orientamento cis/trans. PolyTG/PolyT sono regioni omopolimeriche note per essere difficili da sequenziare a causa dello scivolamento della polimerasi.

Componenti del prodotto

TruSight Cystic Fibrosis Kit consiste dei componenti seguenti:

- ▶ TruSight Cystic Fibrosis Library Prep (n. di catalogo 20036925)

Reagenti forniti

I reagenti per la preparazione delle librerie TruSight Cystic Fibrosis sono forniti da Illumina. Il kit è stato configurato per 1-4 utilizzi con un massimo di 96 campioni per kit.

TruSight Cystic Fibrosis Library Prep, scatola 1

I reagenti contenuti nella scatola 1 sono forniti congelati e sono stabili se conservati a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C. I reagenti sono stabili per un massimo di sei cicli di congelamento/scongelo eseguiti prima della data di scadenza indicata.

Tabella 7 Scatola 1A Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Pool di oligonucleotidi per la fibrosi cistica	1 provetta	600 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente oligonucleotidi mirati al gene <i>CFTR</i>	tra -25 °C e -15 °C
Tampone di ibridazione	1 provetta	4,32 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e formammide.	tra -25 °C e -15 °C
Extension-Ligation Mix	1 provetta	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente una miscela proprietaria di DNA polimerasi, DNA ligasi e dNTP.	tra -25 °C e -15 °C
Index Primer 2 (A501-A508)	1 provetta per primer	192 µl	Primer per PCR con sequenze d'indice e adattatori di sequenziamento.	tra -25 °C e -15 °C
Index Primer 1 (A701-A712)	1 provetta per primer	128 µl	Primer per PCR con sequenze d'indice e adattatori di sequenziamento.	tra -25 °C e -15 °C
PCR polimerasi	1 provetta	56 µl	DNA polimerasi proprietaria.	tra -25 °C e -15 °C
PCR Master Mix	1 provetta	2,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e dNTP.	tra -25 °C e -15 °C

Tabella 8 Scatola 1B Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Diluyente di normalizzazione della libreria	1 provetta	4,6 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide.	tra -25 °C e -15 °C
Tampone di diluizione libreria	1 provetta	4,5 ml	Soluzione acquosa tamponata.	tra -25 °C e -15 °C
Campione di controllo interno PhiX	1 provetta	10 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente DNA genomico PhiX.	tra -25 °C e -15 °C

TruSight Cystic Fibrosis Library Prep, scatola 2

I reagenti contenuti nella scatola 2 sono spediti a temperatura ambiente e rimangono stabili se conservati a una temperatura compresa tra 15 °C e 30 °C fino alla data di scadenza indicata.

Tabella 9 Scatola 2 Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Piastra filtro	4 piastre	N/D	Piastra di microtitolazione in polipropilene con una membrana in polietersulfone modificata.	tra 15 °C e 30 °C

Tabella 10 Scatola 2 Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento (ml)	Ingredienti attivi	Conservazione
Tampone di eluizione	1 provetta	4,8	Soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C
Tampone di conservazione della libreria	1 provetta	3,5	Soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C

TruSight Cystic Fibrosis Library Prep, scatola 3

I reagenti contenuti nella scatola 3 sono spediti refrigerati e rimangono stabili se conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C fino alla data di scadenza indicata.

Tabella 11 Scatola 3A Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento (ml)	Ingredienti attivi	Conservazione
Tampone di lavaggio stringente	1 flacone	24	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide.	tra 2 °C e 8 °C
Tampone di lavaggio universale	1 provetta	4,8	Soluzione acquosa tamponata contenente sali.	tra 2 °C e 8 °C

Tabella 12 Scatola 3B Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento (ml)	Ingredienti attivi	Conservazione
Microsfere per la pulizia della PCR	1 provetta	5	Soluzione acquosa tamponata contenente microsfere paramagnetiche in fase solida e polietilene glicole.	tra 2 °C e 8 °C
Lavaggio di normalizzazione della libreria	2 provette	4,8	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide.	tra 2 °C e 8 °C
Microsfere della libreria	1 provetta	1,2	Soluzione acquosa tamponata contenente microsfere paramagnetiche in fase solida.	tra 2 °C e 8 °C

Reagenti richiesti, non forniti

Reagenti pre-amplificazione

- ▶ 10 N NaOH (preparare da compresse o con una soluzione standard)
- ▶ Tampone TE
- ▶ Acqua priva di DNasi/RNasi

Reagenti post-amplificazione

- ▶ 10 N NaOH (preparare da compresse o con una soluzione standard)
- ▶ Etanolo (EtOH), 200 proof per biologia molecolare
- ▶ Tampone TE
- ▶ Acqua priva di DNasi/RNasi

Reagenti MiSeqDx

- ▶ MiSeqDx Reagent Kit v3 (n. di catalogo 20012552 o 20037124, in base alla regione)
- ▶ Ipoclorito di sodio al 5%
- ▶ Tween 20
- ▶ Acqua da laboratorio

Conservazione e manipolazione

- 1 Per temperatura ambiente si intende la temperatura compresa tra 15 °C e 30 °C.
- 2 I reagenti del tampone di ibridazione, del tampone di lavaggio stringente e del diluente di normalizzazione della libreria potrebbero formare precipitati o cristalli visibili. Prima dell'uso, agitare energicamente con un vortex, quindi ispezionare visivamente per accertarsi che non vi sia presenza di precipitati.
- 3 Nella manipolazione delle microsferi per la pulizia della PCR e delle microsferi della libreria attenersi alle migliori pratiche riportate di seguito:
 - ▶ Le microsferi non devono mai essere congelate.
 - ▶ Portarle le microsferi a temperatura ambiente.
 - ▶ Immediatamente prima dell'uso, agitarle bene le microsferi finché sospensione e colore appaiono omogenei.
 - ▶ Dopo aver aggiunto le microsferi miscelare bene il campione pipettando su e giù dieci volte. Per miscelare il campione è possibile utilizzare uno shaker.
 - ▶ Incubare la miscela di microsferi/campione a temperatura ambiente per tutta la durata indicata.
 - ▶ Seguire le istruzioni per l'uso del supporto magnetico. Attendere che la soluzione diventi trasparente prima di aspirare. Tenere la piastra sul supporto magnetico quando si aspira lentamente il supernatante, facendo attenzione a non toccare le microsferi separate.
- 4 Non congelare il reagente delle microsferi o miscelarlo con il reagente del diluente di normalizzazione della libreria se non vengono utilizzati immediatamente.

Apparecchiature e materiali

Apparecchiature e materiali di consumo forniti, venduti separatamente

- ▶ Strumento MiSeqDx, n. di catalogo DX-410-1001
- ▶ TruSeq Index Plate Fixture Kit, n. di catalogo FC-130-1005
- ▶ TruSeq Index Plate Fixture & Collar Kit, n. di catalogo FC-130-1007
- ▶ Tappi sostitutivi per adattatore indice, n. di catalogo DX-502-1003
- ▶ Provetta MiSeq, n. di catalogo MS-102-9999

Apparecchiature e materiali richiesti, non forniti

Apparecchiature e materiali per pre-amplificazione

- ▶ **Blocco termico:** è necessario un blocco termico per una piastra a 96 pozzetti. Sono accettabili i blocchi termici con coperchi riscaldati. L'utilizzo di termociclatori o blocchi termici a raffreddamento attivo (ad es., Peltier, raffreddato termoelettricamente) non è consigliato per la fase di ibridazione. La fase di raffreddamento passivo è cruciale per un'adeguata ibridazione. Il blocco termico deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione:
 - ▶ Intervallo di temperatura: ambiente da +5 °C a 99 °C
 - ▶ Regolazione della temperatura: da ± 0,1 °C a 37 °C; da ± 0,4 °C a 60 °C

- ▶ **Incubatore di campioni:** è necessario un incubatore (forno per ibridazione). L'incubatore deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione:
 - ▶ Intervallo di temperatura: da 10 °C a 100 °C
 - ▶ Regolazione della temperatura: $\pm 0,2$ °C
- ▶ **Centrifuga da tavolo:** è necessaria una centrifuga da tavolo con controllo della temperatura in grado di mantenere la temperatura di 20 °C. Come specificato sopra, nell'area di post-amplificazione è necessaria un'altra centrifuga. È possibile utilizzare una qualsiasi centrifuga per piastre compatibile con una piastra a 96 pozzetti con unità filtro e che raggiunga le velocità previste dal protocollo (da 280 a 2.400 x g).
- ▶ **Pipette di precisione:** è necessario un set di pipette di precisione. Come specificato sopra, nell'area di post-amplificazione è necessario un altro set. L'utilizzo di pipette di precisione è necessario per assicurare un'erogazione accurata di reagente e campione. È possibile utilizzare sia pipette monocanale che multicanale se calibrate regolarmente e precise entro un margine del 5% del volume indicato.
- ▶ **Materiali di consumo:** sono necessari i seguenti materiali di consumo:
 - ▶ Piastre skirted per PCR a 96 pozzetti, 0,2 ml, in polipropilene, o equivalente
 - ▶ Piastre di conservazione a 96 pozzetti, 0,8 ml (piastre MIDI)
 - ▶ Bacinella per soluzione, in PVC, priva di DNasi e RNasi (vaschetta)
 - ▶ Sigillo adesivo in alluminio
 - ▶ Sigillo per piastra PCR appropriato
 - ▶ Punte per pipette dotate di barriera aerosol
 - ▶ Provette coniche, 15 ml

Apparecchiature e materiali per post-amplificazione

- ▶ **Termociclatore:** è necessario un termociclatore. Il termociclatore deve essere dotato di un coperchio riscaldato e soddisfare le seguenti specifiche di prestazione:
 - ▶ Intervallo di controllo della temperatura: da 4 °C a 99 °C
 - ▶ Accuratezza del controllo: $\pm 0,25$ °C da 35 °C a 99 °C
- ▶ **Shaker per micropiastre:** nell'area adibita al laboratorio post-amplificazione è necessario uno shaker per micropiastre. Lo shaker per piastre deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione:
 - ▶ Velocità massima di miscelazione: 3.000 giri/min
 - ▶ Intervallo di velocità di miscelazione: 200-3.000 giri/min
- ▶ **Centrifuga da tavolo:** è necessaria una centrifuga da tavolo in grado di mantenere la temperatura di 20 °C. Come specificato sopra, nell'area di pre-amplificazione è necessaria un'altra centrifuga. Qualsiasi centrifuga per piastre che raggiunga le velocità previste dal protocollo (da 280 a 2.400 x g) è accettabile.
- ▶ **Blocco termico:** è necessario un blocco termico per le provette. Il blocco termico deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione:
 - ▶ Intervallo di temperatura: ambiente da +5 °C a 99 °C
 - ▶ Regolazione della temperatura: da $\pm 0,1$ °C a 37 °C; da $\pm 0,4$ °C a 60 °C
- ▶ **Supporto magnetico:** è necessario un supporto magnetico per una piastra a 96 pozzetti. Le prestazioni migliori si osservano quando i magneti si trovano sul lato del supporto e non nella parte inferiore.
- ▶ **Pipette di precisione:** è necessario un set di pipette di precisione. Come specificato sopra, nell'area di pre-amplificazione è necessario un altro set. L'utilizzo di pipette di precisione è necessario per assicurare un'erogazione accurata di reagente e campione. È possibile utilizzare sia pipette monocanale che multicanale se calibrate regolarmente e precise entro un margine del 5% del volume indicato.
- ▶ **Centrifuga da tavolo:** è necessaria una centrifuga con controllo della temperatura in grado di mantenerla costantemente a 20 °C e che alloggi le provette per microcentrifuga richieste. Qualsiasi centrifuga che raggiunga le velocità previste dal protocollo (da 280 a 1.000 x g) è accettabile.
- ▶ **Materiali di consumo:** sono necessari i seguenti materiali di consumo:
 - ▶ Piastre skirted per PCR a 96 pozzetti, 0,2 ml, in polipropilene, o equivalente
 - ▶ Piastre di conservazione a 96 pozzetti, 0,8 ml (piastre MIDI)



NOTA

Assicurarsi che la piastra a 96 pozzetti sia compatibile con il supporto magnetico.

- ▶ Provette coniche, 15 ml e 50 ml
- ▶ Provette per microcentrifuga (sono consigliate quelle con tappo a vite)
- ▶ Strisce a otto provette per PCR
- ▶ Bacinelle per soluzione, in PVC, priva di DNasi e RNasi (vaschetta)
- ▶ Sigilli adesivi in alluminio
- ▶ Sigilli adesivi per piastra monouso
- ▶ Punte per pipette dotate di barriera aerosol

Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni



NOTA

Manipolare tutti i campioni come agenti potenzialmente infettivi.

- ▶ Possono essere utilizzati campioni di sangue intero raccolti in provette contenenti K₂EDTA.
- ▶ I campioni di sangue intero possono essere conservati per non più di 7 giorni a temperatura ambiente, fino a 30 giorni a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C o fino a 30 giorni se congelati tra -25 °C e -15 °C.
- ▶ I campioni di sangue intero possono essere trasportati per non più di 7 giorni a temperatura ambiente, fino a 30 giorni a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C o fino a 30 giorni se congelati tra -25 °C e -15 °C. Il trasporto di sangue intero deve essere conforme alle regolamentazioni nazionali, federali, statali e locali applicabili per il trasporto di agenti eziologici.
- ▶ Non sono stati osservati eventi avversi sulle prestazioni del saggio allorché il DNA genomico è stato sottoposto a sei cicli di congelamento/scongelo.
- ▶ Non sono stati osservati eventi avversi sulle prestazioni del saggio in presenza di campioni di sangue intero con elevati tassi di bilirubina, colesterolo, trigliceride, EDTA o emoglobina.

Avvertenze e precauzioni



ATTENZIONE

La legge federale limita la vendita di questo dispositivo da parte o dietro prescrizione di un medico o di un medico autorizzato dalla legge dello stato in cui esercita, ad usare o ad ordinare l'uso del dispositivo.



AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene materiali chimici potenzialmente pericolosi. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare l'attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumento da laboratorio appropriato per evitare i rischi di esposizione. Manipolare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni applicabili a livello regionale, nazionale e locale. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS alla pagina Web [.support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html). Per ulteriori informazioni, vedere *Reagenti forniti a pagina 12*.

- ▶ Alcuni componenti di questo saggio contengono 2-mercaptoetanololo, un agente riducente. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Utilizzarlo in un'area ben ventilata e smaltire i contenitori e i contenuti non utilizzati in conformità agli standard applicabili di sicurezza in vigore localmente. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS alla pagina Web [.support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html). Per ulteriori informazioni, vedere *Reagenti forniti a pagina 12*.

- ▶ Alcuni componenti di questo saggio contengono formammide, una amide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumento da laboratorio. Maneggiare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base agli standard di sicurezza in vigore nel proprio paese. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS alla pagina Web [.support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html). Per ulteriori informazioni, vedere *Reagenti forniti a pagina 12*.
- ▶ Manipolare tutti i campioni come agenti potenzialmente infettivi.
- ▶ Il mancato rispetto delle procedure descritte può produrre risultati errati o una riduzione significativa della qualità del campione.
- ▶ Adottare le normali precauzioni di laboratorio. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere o fumare nelle aree designate per il lavoro. Manipolare i campioni e i reagenti del saggio indossando guanti e indumenti da laboratorio monouso. Dopo aver maneggiato i campioni e i reagenti del saggio lavarsi bene le mani.
- ▶ Non utilizzare i componenti del saggio oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione del saggio. Non scambiare i componenti di diversi lotti di saggi. I lotti dei saggi sono identificati sull'etichetta della scatola del saggio.
- ▶ Per impedire la degradazione del campione o del reagente, assicurarsi che tutti i vapori di ipoclorito di sodio siano stati dissipati completamente prima di avviare il protocollo.
- ▶ È necessario adottare pratiche di laboratorio e igiene di laboratorio idonee per impedire la contaminazione di reagenti, strumenti e campioni di DNA genomico con i prodotti della PCR. La contaminazione da PCR può produrre risultati inesatti e inaffidabili.
- ▶ Cambiamenti nell'aspetto fisico dei reagenti forniti possono indicare un deterioramento dei materiali. Non utilizzare i reagenti in caso di cambiamenti nell'aspetto fisico (ad es., variazioni evidenti nel colore del reagente oppure opacità visibile con contaminazione microbica).
- ▶ Al fine di prevenire la contaminazione, separare fisicamente le aree di pre-amplificazione e di post-amplificazione e assicurarsi che le aree di pre-amplificazione e di post-amplificazione siano dotate di apparecchiatura dedicata (ad es., pipette, punte per pipette, vortex e centrifughe).
- ▶ Evitare la contaminazione incrociata. Utilizzare punte per pipette nuove fra un campione e l'altro e fra le erogazioni di reagenti. Miscelare i campioni con una pipetta e centrifugare la piastra ove indicato. Non agitare le piastre. L'utilizzo di punte dotate di barriera aerosol riduce il rischio di contaminazione incrociata da carry-over di ampliconi o da campione a campione.
- ▶ L'accoppiamento indice-campione deve corrispondere alle informazioni sul campione immesse per la corsa MiSeqDx. La mancata corrispondenza tra le informazioni sui campioni e il layout della piastra risulterà in un'identificazione errata del campione e nel riportare risultati errati.
- ▶ Per le fasi di lavaggio, preparare sempre al momento etanolo all'80%. L'etanolo può assorbire l'acqua dall'aria e influire sui risultati.
- ▶ Rispettare il tempo di asciugatura indicato dopo la fase del supporto magnetico per assicurare che l'evaporazione sia completa. L'etanolo residuo può influire sulle prestazioni delle reazioni successive.
- ▶ Conservare i componenti del saggio alla temperatura indicata e in aree designate per la pre-amplificazione e la post-amplificazione.
- ▶ Cicli ripetuti di congelamento-scongelo (fino a sei) dei componenti dalla scatola 1 non compromettono l'integrità del saggio.
- ▶ Non mescolare il raggruppamento in pool di oligonucleotidi per la fibrosi cistica e il tampone di ibridazione per la conservazione. Usato in combinazione, il raggruppamento in pool di oligonucleotidi per la fibrosi cistica diventa instabile, anche se conservato congelato.
- ▶ L'utilizzo di termociclatori a raffreddamento attivo (ad es., Peltier, raffreddato termoelettricamente) non è consigliato per la fase di ibridazione. La fase di raffreddamento passivo è cruciale per un'adeguata ibridazione.
- ▶ Aggiungere sempre PCR polimerasi al Master Mix per PCR immediatamente prima dell'uso. Non conservare mai la Master Mix combinata.

- ▶ Durante la fase di normalizzazione della libreria, è estremamente importante risospingere completamente il pellet di microsferi della libreria. Questo è fondamentale per ottenere una densità cluster omogenea sulla cella a flusso dello strumento MiSeqDx.
- ▶ Rispettare i tempi di incubazione specificati per la fase di normalizzazione della libreria. Un'incubazione inadeguata può influire sulla rappresentazione della libreria e sulla densità cluster.
- ▶ A causa del numero di trasferimenti della piastra e della conseguente potenziale contaminazione, è importante fare molta attenzione per assicurare che il contenuto dei pozzetti rimanga totalmente al loro interno. Non far schizzare il contenuto.
- ▶ L'input di DNA di 250 ng raccomandato permette la variazione della quantità del DNA. Le prestazioni del saggio si basano su questo livello di input.
- ▶ Le varianti dei campioni designati come No Call (Identificazione non riuscita) sul report del test indica che i dati per quella posizione della variante non corrispondono alle soglie di sequenziamento definite. Non riportare le varianti con una designazione No Call (Identificazione non riuscita) a meno che la ripetizione del test non fornisca valori che corrispondono alle soglie definite e non siano più designati come No Call (Identificazione non riuscita).

Acronimi

Tabella 13 Acronimi di TruSight Cystic Fibrosis Library Prep

Acronimo	Definizione
AMP	Piastra di amplificazione
CLP	Piastra di pulizia
DAL	Libreria di ampliconi diluiti
FPU	Unità piastra filtro
HYB	Piastra di ibridazione
LNP	Piastra di normalizzazione della libreria
NTC	Controllo senza template
PAL	Libreria di ampliconi raggruppati in pool
SGP	Piastra di conservazione

Risorse aggiuntive

Le pagine di supporto di TruSight Cystic Fibrosis sul sito Web Illumina forniscono informazioni su software, risorse per la formazione, compatibilità dei prodotti e la documentazione seguente. Controllare sempre le pagine di supporto per verificare le ultime versioni disponibili.

Risorsa	Descrizione
<i>Guida al flusso di lavoro del modulo di analisi CF 139-Variant 2.0 per Local Run Manager (documento n. 1000000100945)</i>	Fornisce istruzioni per l'impostazione dei parametri di una corsa per il sequenziamento e l'analisi sul modulo di analisi CF 139-Variant 2.0.
<i>Guida al flusso di lavoro del modulo di analisi CF Clinical Seq 2.0 per Local Run Manager (documento n. 1000000100946)</i>	Fornisce istruzioni per l'impostazione dei parametri di una corsa per il sequenziamento e l'analisi sul modulo di analisi CF Clinical Seq 2.0.
<i>Guida di consultazione del software Local Run Manager per MiSeqDx (documento n. 100000011880)</i>	Fornisce istruzioni per la creazione di una corsa, lo stato del monitoraggio, l'analisi dei dati di sequenziamento e la visualizzazione dei risultati sullo strumento MiSeqDx.
<i>Guida di consultazione dello strumento MiSeqDx per MOS v2 (documento n. 100000021961)</i>	Fornisce istruzioni per l'impostazione e il sequenziamento delle corse, incluse le procedure di manutenzione per lo strumento MiSeqDx.

Note sulle procedure

- ▶ Illumina ritiene necessario che per ogni corsa, definita come una serie di campioni elaborati in parallelo, vengano inclusi un campione di DNA di controllo positivo e un controllo negativo (NTC o No Template Control, controllo senza template). Il campione di DNA di controllo positivo deve essere un campione ben caratterizzato con una o più varianti note del gene CFTR. Illumina raccomanda di usare un controllo wild type. Il controllo wild type deve essere eseguito come un campione e non deve sostituire il controllo positivo o negativo.
- ▶ Prima di avviare il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant o il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, estrarre e quantificare il DNA da sangue intero.
- ▶ È possibile utilizzare qualsiasi metodo di estrazione del DNA convalidato.
- ▶ Quantificare il DNA con uno spettrofotometro. Verificare che A260/A280 del campione di DNA sia > 1,5. Normalizzare il campione di DNA a 50 ng/μl. Ciascun esempio richiede 5 μl di DNA genomico (totale di 250 ng).
- ▶ Conservare i componenti del saggio alla temperatura indicata e in aree designate per la pre-amplificazione e la post-amplificazione.
- ▶ Cicli ripetuti di congelamento-scongelo (fino a sei) dei componenti dalla scatola 1 non compromettono l'integrità del saggio.

Rendimento dei campioni

Per il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant e il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, il rendimento dei campioni per la corsa MiSeqDx è di 24-96 campioni. I primer di indicizzazione utilizzati durante l'amplificazione mediante PCR devono essere scelti in base al rendimento finale dei campioni desiderato per assicurare che ciascuna libreria utilizzi una combinazione di indici univoca.



NOTA

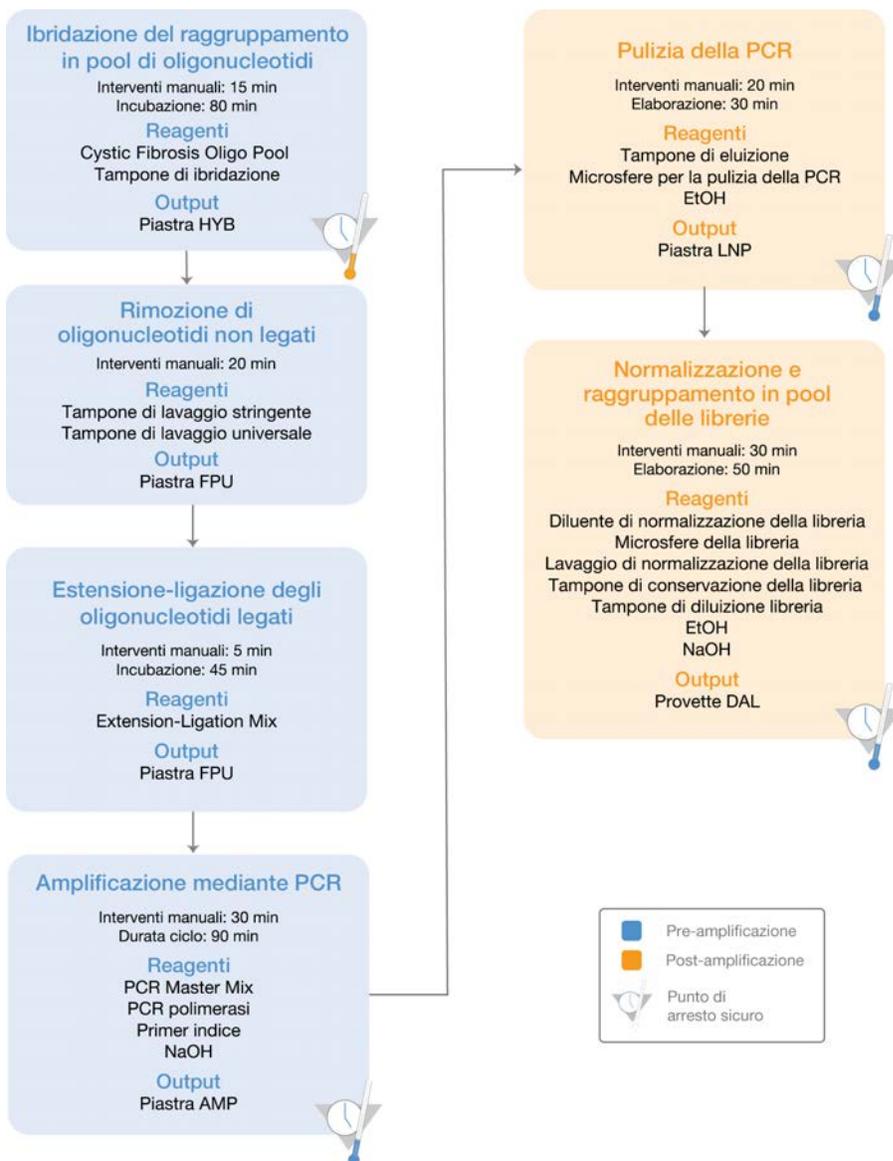
La prosecuzione con meno di 24 campioni non è convalidata da Illumina.

Flusso di lavoro di preparazione delle librerie

Il diagramma seguente illustra il flusso di lavoro per la preparazione delle librerie per il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant e per il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing. Le fasi di pre-amplificazione includono: ibridazione del raggruppamento in pool di oligonucleotidi, rimozione di oligonucleotidi non legati ed estensione-ligazione di oligonucleotidi non legati. Per la fase di amplificazione mediante PCR, l'impostazione della piastra PCR avviene nell'area di pre-amplificazione, mentre la PCR sul termociclatore avviene nell'area post-amplificazione. Le fasi di post-amplificazione: pulizia della PCR e normalizzazione e raggruppamento in pool delle librerie.

Fra i vari passaggi sono contrassegnati i punti di arresto sicuri.

Figura 1 Flusso di lavoro per la preparazione delle librerie per il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant e per il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing



Istruzioni per l'uso

La preparazione delle librerie TruSight Cystic Fibrosis supporta due saggi: il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant e il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing. Il flusso di lavoro TruSight Cystic Fibrosis include la selezione del saggio, la preparazione delle librerie, il sequenziamento e il lavaggio post-corsa. Fatta eccezione per la selezione del saggio, tutte le fasi della procedura sono identiche per entrambi i saggi.

Selezione del saggio e impostazione della corsa

- ▶ Se si utilizza il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant, vedere *Utilizzo del modulo di analisi CF-139 Variant 2.0 per Local Run Manager* a pagina 21.
- ▶ Se si utilizza il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, vedere *Utilizzo del modulo di analisi CF Clinical Seq 2.0 per Local Run Manager* a pagina 22.

Utilizzo del modulo di analisi CF-139 Variant 2.0 per Local Run Manager

Impostazione dei parametri

- 1 Accedere a **Local Run Manager**.
- 2 Selezionare **Create Run** (Crea corsa), quindi selezionare **CF 139-Variant 2.0**.
- 3 Immettere un nome che identifichi la corsa dal sequenziamento fino all'analisi.
Utilizzare caratteri alfanumerici, spazi, trattini bassi o trattini (40 caratteri o un numero inferiore).
- 4 **[Facoltativo]** Immettere una descrizione della corsa.
Utilizzare caratteri alfanumerici, spazi, trattini bassi o trattini (150 caratteri o un numero inferiore).
- 5 Immettere il numero di lotto e data di scadenza per il kit di preparazione delle librerie.

Impostazione dei campioni per la corsa

Specificare i campioni per la corsa mediante una delle seguenti opzioni.

- ▶ **Immissione manuale dei campioni:** utilizzare la tabella vuota che si trova nella schermata Create Run (Crea corsa). Sono evidenziati i pozzetti di campione suggeriti.
- ▶ **Importazione dei campioni:** individuare un file esterno nel formato con valori separati da virgola (*.csv). Dalla schermata Create Run (Crea corsa) è possibile scaricare un modello.

Immissione manuale dei campioni

- 1 Immettere un nome campione univoco nel campo Sample Name (Nome campione).
Utilizzare caratteri alfanumerici, trattini o trattini bassi (40 caratteri o un numero inferiore).
- 2 Fare clic con il pulsante destro del mouse e selezionare i campioni di controllo positivi e negativi.
Per salvare una corsa è necessario avere almeno un controllo positivo e un controllo negativo.
- 3 **[Facoltativo]** Immettere una descrizione del campione nella scheda Description (Descrizione).
Utilizzare caratteri alfanumerici, trattini o trattini bassi (50 caratteri o un numero inferiore).
- 4 **[Facoltativo]** Selezionare un adattatore indice 1 dall'elenco a discesa Index 1 (i7) (Indice 1 - i7).
Questa è facoltativa perché, per impostazione predefinita, le combinazioni indici i7 e i5 vengono popolate automaticamente.
- 5 **[Facoltativo]** Selezionare un adattatore indice 2 dall'elenco a discesa Index 2 (i5) (Indice 2 - i5).
Questa è facoltativa perché, per impostazione predefinita, le combinazioni indici i7 e i5 vengono popolate automaticamente.
- 6 Selezionare l'icona **Print** (Stampa) per visualizzare il layout della piastra.
- 7 Selezionare **Print** (Stampa) per stampare il layout della piastra da utilizzare come riferimento per la preparazione delle librerie.
- 8 **[Facoltativo]** Selezionare **Export** (Esporta) per esportare il file delle informazioni sui campioni.
- 9 Selezionare **Save Run** (Salva corsa).
Se vengono inseriti meno di 24 campioni, viene visualizzata la finestra Insufficient Sample (Campione insufficiente). Selezionare **Proceed** (Prosegui) per continuare oppure selezionare **Cancel** (Annulla) per modificare i campioni.



ATTENZIONE

Il sequenziamento con librerie raggruppate in pool che contengono meno di 24 campioni non sono convalidate da Illumina.

Importazione dei campioni

Le informazioni dei campioni possono essere importate da due tipi di file:

- ▶ Un file contenente le informazioni sui campioni precedentemente esportato dal modulo CF 139-Variant 2.0 mediante la funzione Export (Esporta).

- Un file con il modello può essere generato selezionando **Template** (Modello) sulla schermata Create Run (Crea corsa). Il file con il modello contiene le intestazioni di colonna corrette per eseguire l'importazione, con informazioni sui segnaposti contenuti in ogni colonna. Utilizzare un editor esterno per personalizzare il file con il modello:

- 1 Aggiungere le informazioni sui campioni per ogni campione della corsa.
- 2 Una volta aggiunte tutte le informazioni sui campioni, eliminare qualsiasi informazione segnaposto nelle caselle non utilizzate.
- 3 Salvare il file con il modello.

Per importare le informazioni sui campioni:

- 1 Selezionare **Import Samples** (Importa campioni), quindi individuare il file e selezionarlo.
- 2 Selezionare l'icona **Print** (Stampa) per visualizzare il layout della piastra.
- 3 Selezionare **Print** (Stampa) per stampare il layout della piastra da utilizzare come riferimento per la preparazione delle librerie.
- 4 Selezionare **Save Run** (Salva corsa).
Se vengono inseriti meno di 24 campioni, viene visualizzata la finestra Insufficient Sample (Campione insufficiente). Selezionare **Proceed** (Prosegui) per continuare oppure selezionare **Cancel** (Annulla) per modificare i campioni.



ATTENZIONE

Il sequenziamento con librerie raggruppate in pool che contengono meno di 24 campioni non sono convalidate da Illumina.

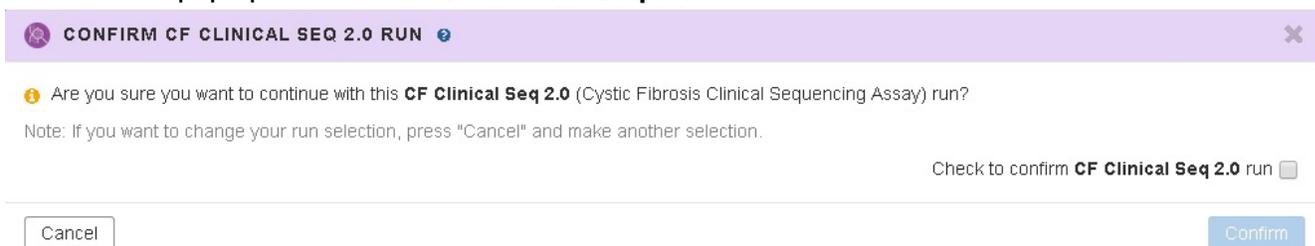
Modifica di una corsa

Per istruzioni su come modificare le informazioni della corsa prima del sequenziamento, vedere la *Guida di consultazione del software Local Run Manager per MiSeqDx (documento n. 1000000011880)*.

Utilizzo del modulo di analisi CF Clinical Seq 2.0 per Local Run Manager

Impostazione dei parametri

- 1 Accedere a Local Run Manager.
- 2 Selezionare **Create Run** (Crea corsa), quindi selezionare **CF Clinical Seq 2.0**.
Una finestra di pop-up conferma che **CF Clinical Seq 2.0** è la selezione scelta.



- 3 Selezionare la casella di controllo e selezionare **Confirm** (Conferma) per proseguire (oppure selezionare **Cancel** (Annulla) per tornare alla schermata principale).
- 4 Immettere un nome che identifichi la corsa dal sequenziamento fino all'analisi.
Utilizzare caratteri alfanumerici, spazi, trattini bassi o trattini (40 caratteri o un numero inferiore).
- 5 **[Facoltativo]** Immettere una descrizione della corsa.
Utilizzare caratteri alfanumerici, spazi, trattini bassi o trattini (150 caratteri o un numero inferiore).
- 6 Immettere il numero di lotto e data di scadenza per il kit di preparazione delle librerie.

Impostazione dei campioni per la corsa

Specificare i campioni per la corsa mediante una delle seguenti opzioni.

- ▶ **Immissione manuale dei campioni:** utilizzare la tabella vuota che si trova nella schermata Create Run (Crea corsa). Sono evidenziati i pozzetti di campione suggeriti.
- ▶ **Importazione dei campioni:** individuare un file esterno nel formato con valori separati da virgola (*.csv). Dalla schermata Create Run (Crea corsa) è possibile scaricare un modello.

Immissione manuale dei campioni

- 1 **Immettere un nome campione univoco nel campo Sample Name (Nome campione).**
Utilizzare caratteri alfanumerici, trattini o trattini bassi (40 caratteri o un numero inferiore).
- 2 **Fare clic con il pulsante destro del mouse e selezionare i campioni di controllo positivi e negativi.**
Per salvare una corsa è necessario avere almeno un controllo positivo e un controllo negativo.
- 3 **[Facoltativo] Immettere una descrizione del campione nella scheda Description (Descrizione).**
Utilizzare caratteri alfanumerici, trattini o trattini bassi (50 caratteri o un numero inferiore).
- 4 **[Facoltativo] Selezionare un adattatore indice 1 dall'elenco a discesa Index 1 (i7) (Indice 1 - i7).**
Questa è facoltativa perché, per impostazione predefinita, le combinazioni indici i7 e i5 vengono popolate automaticamente.
- 5 **[Facoltativo] Selezionare un adattatore indice 2 dall'elenco a discesa Index 2 (i5) (Indice 2 - i5).**
Questa è facoltativa perché, per impostazione predefinita, le combinazioni indici i7 e i5 vengono popolate automaticamente.
- 6 **Selezionare l'icona **Print** (Stampa) per visualizzare il layout della piastra.**
- 7 **Selezionare **Print** (Stampa) per stampare il layout della piastra da utilizzare come riferimento per la preparazione delle librerie.**
- 8 **[Facoltativo] Selezionare **Export** (Esporta) per esportare il file delle informazioni sui campioni.**
- 9 **Selezionare **Save Run** (Salva corsa).**
Se vengono inseriti meno di 24 campioni, viene visualizzata la finestra Insufficient Sample (Campione insufficiente). Selezionare **Proceed** (Prosegui) per continuare oppure selezionare **Cancel** (Annulla) per modificare i campioni.



ATTENZIONE

Il sequenziamento con librerie raggruppate in pool che contengono meno di 24 campioni non sono convalidate da Illumina.

Importazione dei campioni

Le informazioni dei campioni possono essere importate da due tipi di file:

- ▶ Un file contenente le informazioni sui campioni precedentemente esportato dal modulo CF Clinical Seq 2.0 mediante la funzione Export (Esporta).
- ▶ Un file con il modello può essere generato selezionando **Template** (Modello) sulla schermata Create Run (Crea corsa). Il file con il modello contiene le intestazioni di colonna corrette per eseguire l'importazione, con informazioni sui segnaposti contenuti in ogni colonna. Utilizzare un editor esterno per personalizzare il file con il modello:
 - 1 Aggiungere le informazioni sui campioni per ogni campione della corsa.
 - 2 Una volta aggiunte tutte le informazioni sui campioni, eliminare qualsiasi informazione segnaposto nelle caselle non utilizzate.
 - 3 Salvare il file con il modello.

Per importare le informazioni sui campioni:

- 1 Selezionare **Import Samples** (Importa campioni), quindi individuare il file e selezionarlo.
- 2 Selezionare l'icona **Print** (Stampa) per visualizzare il layout della piastra.
- 3 Selezionare **Print** (Stampa) per stampare il layout della piastra da utilizzare come riferimento per la preparazione delle librerie.
- 4 Selezionare **Save Run** (Salva corsa).

Se vengono inseriti meno di 24 campioni, viene visualizzata la finestra Insufficient Sample (Campione insufficiente). Selezionare **Proceed** (Prosegui) per continuare oppure selezionare **Cancel** (Annulla) per modificare i campioni.



ATTENZIONE

Il sequenziamento con librerie raggruppate in pool che contengono meno di 24 campioni non sono convalidate da Illumina.

Modifica di una corsa

Per istruzioni su come modificare le informazioni della corsa prima del sequenziamento, vedere la *Guida di consultazione del software Local Run Manager per MiSeqDx (documento n. 1000000011880)*.

Preparazione delle librerie



NOTA

Il flusso di lavoro per la preparazione delle librerie è identico sia per il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant che per il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing.

Ibridazione del raggruppamento in pool di oligonucleotidi

Materiali di consumo

- ▶ Piastra per PCR a 96 pozzetti
- ▶ Campioni di DNA genomico (gDNA)
- ▶ Tampone di ibridazione
- ▶ Campione di controllo positivo
- ▶ Pool di oligonucleotidi per la fibrosi cistica
- ▶ Tampone TE
- ▶ Sigillo adesivo in alluminio

Preparazione

1 Preparare i seguenti materiali di consumo:

Reagente	Conservazione	Istruzioni
Tampone di ibridazione	tra -25 °C e -15 °C	Portare a temperatura ambiente. Agitare vigorosamente per assicurarsi che tutti i precipitati siano completamente disciolti, quindi centrifugare brevemente le provette per raccogliere il liquido.
Pool di oligonucleotidi per la fibrosi cistica	tra -25 °C e -15 °C	Portare a temperatura ambiente. Agitare vigorosamente per assicurarsi che tutti i precipitati siano completamente disciolti, quindi centrifugare brevemente le provette per raccogliere il liquido.

- 2 Portare a temperatura ambiente i campioni gDNA e il campione di controllo positivo e negativo.
- 3 Impostare un blocco termico per piastra a 96 pozzetti su 95 °C.
- 4 Preriscaldare un incubatore a 37 °C.

Procedura

- 1 Etichettare una nuova piastra HYB per PCR a 96 pozzetti.
- 2 Creare una piastra campioni in base al grafico della piastra stampato ottenuto da Local Run Manager.
- 3 Attenendosi al layout della piastra generato da Local Run Manager, dispensare 5 µl di controllo negativo (ad es., tampone TE) nell'appropriato pozzetto della piastra HYB.
- 4 Dispensare 5 µl di campione o campione di controllo a 50 ng/µl (250 ng totali) nei pozzetti appropriati nella piastra HYB.

- 5 Dispensare 5 µl il raggruppamento in pool di oligonucleotidi per fibrosi cistica in ogni pozzetto di campione.
- 6 Dispensare 40 µl di tampone di ibridazione in ogni pozzetto contenente il campione sulla piastra HYB.
- 7 Pipettare delicatamente su e giù 3-5 volte per miscelare.
- 8 Sigillare la piastra HYB e centrifugare a 1.000 × g a 20 °C per un minuto.
- 9 Inserire la piastra HYB nel blocco preriscaldato a 95 °C e incubare per un minuto.
- 10 Ridurre la temperatura del blocco termico a 40 °C e continuare a incubare fino a quando il blocco termico raggiunge 40 °C (circa 80 minuti).
La fase di raffreddamento graduale è cruciale per un'adeguata ibridazione.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Quando il blocco termico raggiunge i 40 °C, la piastra HYB è stabile a una temperatura di 40 °C per due ore.

Rimozione di oligonucleotidi non legati

Materiali di consumo

- ▶ Extension-Ligation Mix
- ▶ Piastra filtro
- ▶ Tampone di lavaggio stringente
- ▶ Tampone di lavaggio universale
- ▶ Piastra MIDI

Preparazione

- 1 Preparare i seguenti materiali di consumo:

Reagente	Conservazione	Istruzioni
Extension-Ligation Mix	tra -25 °C e -15 °C	Portare a temperatura ambiente. Utilizzare un vortex per miscelare.
Tampone di lavaggio stringente	tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente. Agitare vigorosamente. Assicurarsi che tutti i precipitati siano disciolti.
Tampone di lavaggio universale	tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente. Utilizzare un vortex per miscelare.

- 2 Assemblare l'unità piastra filtro (FPU) **dall'alto verso il basso**:
 - Coperchio
 - Piastra filtro
 - Colletto adattatore
 - Piastra MIDI
- 3 Pre-lavare la membrana della piastra filtro nel modo seguente.
 - a Dispensare 45 µl di tampone di lavaggio stringente in ciascun pozzetto.
 - b Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 × g a 20 °C per cinque minuti.
- 4 Verificare che tutti i pozzetti della piastra filtro siano completamente drenati. Se il tampone di lavaggio non si asciuga completamente, centrifugare di nuovo a 2.400 × g a 20 °C finché tutto il liquido non viene espulso (ulteriori 5-10 minuti).



ATTENZIONE

Durante le fasi di lavaggio è fondamentale controllare la temperatura della centrifuga. Se la temperatura raggiunge i 25 °C, o una temperatura maggiore, questa potrebbe provocare un legame dei primer più stringente. In casi rari, se i campioni presentano SNV nelle regioni di legame dei primer, la maggiore rigidità potrebbe portare a una perdita di alleli.

Procedura

- 1 Estrarre la piastra HYB dal blocco termico e centrifugare a $1.000 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per un minuto.
- 2 Con una pipetta multicanale impostata su $55\ \mu\text{l}$, trasferire l'intero volume di ciascun campione nei corrispondenti pozzetti della piastra filtro.
- 3 Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a $2.400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per cinque minuti.
- 4 Lavare la piastra filtro nel modo seguente.
 - a Dispensare $45\ \mu\text{l}$ di tampone di lavaggio stringente in ciascun pozzetto contenente il campione.
 - b Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a $2.400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per cinque minuti.
- 5 Lavare la piastra una **seconda** volta.
- 6 Se il tampone di lavaggio non si asciuga completamente, centrifugare di nuovo a $2.400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ finché tutto il liquido non viene asciugato (ulteriori 5-10 minuti).
- 7 Smaltire tutto il materiale defluito e riassemblare la piastra FPU.
- 8 Dispensare $45\ \mu\text{l}$ di tampone di lavaggio universale in ogni pozzetto contenente il campione.
- 9 Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a $2.400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 10 minuti.
- 10 Accertarsi che tutto il liquido sia defluito dopo la centrifugazione. Se necessario, ripetere la centrifugazione.

Estensione-ligazione degli oligonucleotidi legati

Materiali di consumo

- ▶ Extension-Ligation Mix
- ▶ Sigillo adesivo in alluminio

Procedura

- 1 Dispensare $45\ \mu\text{l}$ di Extension-Ligation Mix in ogni pozzetto contenente il campione della piastra filtro.
- 2 Sigillare la piastra filtro, quindi coprire con il coperchio.
- 3 Incubare la piastra FPU nell'incubatore preriscaldato a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 45 minuti.
- 4 Durante l'incubazione della piastra FPU, preparare l'AMP (piastra di amplificazione) come descritto nella sezione successiva.

Amplificazione mediante PCR

Materiali di consumo

- ▶ Piastra per PCR a 96 pozzetti
- ▶ Sigillo per piastra PCR
- ▶ Index Primer (A501-A508 e A701-A712)
- ▶ 10 N di NaOH
- ▶ PCR Master Mix
- ▶ PCR polimerasi
- ▶ Provetta conica da 15 ml

Preparazione

- 1 Determinare gli index primer da utilizzare in base al layout grafico stampato della piastra ottenuto da Local Run Manager.

2 Preparare i seguenti materiali di consumo:

Reagente	Conservazione	Istruzioni
Index Primer (A501-A508 e A701-A712)	tra -25 °C e -15 °C	Portare a temperatura ambiente. Utilizzare un vortex per miscelare, quindi centrifugare brevemente.
PCR polimerasi	tra -25 °C e -15 °C	Lasciare in congelatore fino al momento dell'utilizzo per la preparazione della soluzione di lavaggio per PCR.
PCR Master Mix	tra -25 °C e -15 °C	Portare a temperatura ambiente. Utilizzare un vortex per miscelare, quindi centrifugare brevemente.

3 Preparare al momento 0,05 N di NaOH aggiungendo 25 µl di 10 N di NaOH a 4.975 µl di acqua priva di RNasi/DNasi.

4 Etichettare una nuova piastra AMP per PCR a 96 pozzetti.

5 Aggiungere gli index primer alla piastra AMP nel modo seguente.

- a Dispensare 4 µl di index primer 2 (A501-A508) nel pozzetto appropriato della piastra AMP.
- b Smaltire i tappi bianchi originali e applicare tappi bianchi nuovi.
- c Dispensare 4 µl di index primer 1 (A701-A712) nella riga appropriata della piastra AMP.
- d Smaltire i tappi arancioni originali, quindi applicare tappi arancioni nuovi.

6 Preparare i seguenti materiali di consumo:

Reagente	Conservazione	Istruzioni
PCR polimerasi	tra -25 °C e -15 °C	Rimuovere dal luogo di conservazione e centrifugare brevemente. Procedere immediatamente alla fase successiva. Se la PCR polimerasi verrà utilizzata per ulteriori preparazioni, dopo aver preparato la soluzione di lavoro per PCR riportarla nel luogo di conservazione.

7 Preparare la soluzione di lavoro per la PCR nel modo seguente.

**NOTA**

Le istruzioni seguenti includono i volumi richiesti per elaborare 96 campioni. Se viene analizzato un numero inferiore di campioni, regolare di conseguenza i volumi per preservare i reagenti.

- a Per 96 campioni, aggiungere 56 µl di PCR polimerasi a 2,8 ml di Master Mix per PCR.
- b Capovolgere 20 volte per miscelare.

La soluzione di lavoro per la PCR si mantiene stabile a temperatura ambiente per 10 minuti.

Procedura

- 1 Rimuovere la piastra FPU dall'incubatore, quindi rimuovere il sigillo.
- 2 Coprire la piastra filtro con il coperchio, quindi centrifugare a 2.400 × g a 20 °C per due minuti.
- 3 Dispensare 25 µl di 0,05 N di NaOH in ogni pozzetto sulla piastra filtro.
- 4 Pipettare su e giù 5-6 volte.
- 5 Coprire la piastra filtro con il coperchio, quindi incubare a temperatura ambiente per cinque minuti.
- 6 Durante l'incubazione della piastra filtro, trasferire 22 µl di Master Mix per PCR in ogni pozzetto della piastra AMP contenente gli index primer.
- 7 Trasferire i campioni eluiti dal filtro alla piastra AMP nel modo seguente.
 - a Pipettare i campioni nella prima colonna della piastra filtro su e giù 5-6 volte.
 - b Trasferire 20 µl dalla piastra filtro alla colonna corrispondente della piastra AMP.
 - c Pipettare delicatamente su e giù 5-6 volte per miscelare accuratamente il DNA con Master Mix per PCR.
 - d Ripetere le fasi di trasferimento per le colonne restanti dalla piastra filtro alla piastra AMP.
- 8 Sigillare la piastra AMP e assicurarla con un rullo di gomma.
- 9 Centrifugare a 1.000 × g a 20 °C per un minuto.

- 10 Trasferire la piastra AMP nell'area di post-amplificazione.
- 11 Eseguire la PCR utilizzando il seguente programma su un termociclatore:
 - ▶ 95 °C per 3 minuti
 - ▶ 25 cicli di:
 - ▶ 95 °C per 30 secondi
 - ▶ 62 °C per 30 secondi
 - ▶ 72 °C per 60 secondi
 - ▶ 72 °C per 5 minuti
 - ▶ Mantenere la temperatura a 10 °C

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se non si procede immediatamente alla pulizia della PCR, la piastra AMP può restare sul termociclatore per la notte oppure può essere conservata a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per un massimo di 48 ore.

Pulizia della PCR

Materiali di consumo

- ▶ Provetta conica da 50 ml
- ▶ Sigilli adesivi per piastra monouso
- ▶ Due piastre MIDI
- ▶ Tampone di eluizione
- ▶ Microsfere per la pulizia della PCR

Preparazione

- 1 Preparare i seguenti materiali di consumo:

Reagente	Conservazione	Istruzioni
Microsfere per la pulizia della PCR	tra 2 °C e 8 °C	Lasciare trascorrere 30 minuti per portarla a temperatura ambiente.

- 2 Per 96 campioni, preparare al momento EtOH all'80% utilizzando 36ml di EtOH assoluto e 9ml di acqua priva di DNasi/RNasi. Miscelare completamente.



NOTA

Se vengono analizzati meno di 96 campioni, regolare di conseguenza i volumi per preservare i reagenti.

Procedura

- 1 Centrifugare la piastra AMP a 1.000 x g a 20 °C per un minuto.
- 2 Etichettare una nuova piastra MIDI CLP.
- 3 Capovolgere 10 volte le microsfere per la pulizia della PCR. Agitare su vortex energicamente, quindi capovolgere altre 10 volte. Controllare visivamente la soluzione per assicurarsi che le microsfere siano risospese.
- 4 Dispensare 45 µl di microsfere per la pulizia della PCR in ogni pozzetto della piastra CLP.
- 5 Trasferire l'intero prodotto per la PCR da ciascun pozzetto della piastra AMP al corrispondente pozzetto della piastra CLP.
- 6 Sigillare e agitare su uno shaker per micropiastre a 1.800 giri/min per due minuti.
- 7 Incubare a temperatura ambiente senza agitare per 10 minuti.
- 8 Mettere la piastra su un supporto magnetico e attendere che il liquido diventi limpido (circa due minuti).
- 9 Lasciando la piastra CLP sul supporto magnetico, rimuovere attentamente e smaltire il sumatante.

- 10 Lavare le microsfere nel modo seguente.
 - a Lasciando la piastra sul supporto magnetico, dispensare 200 µl di EtOH all'80% appena preparato in ciascun pozzetto.
 - b Attendere almeno 30 secondi o fino a quando il liquido diventa limpido.
 - c Rimuovere e smaltire tutto il surnatante da ogni pozzetto.
- 11 Lavare le microsfere una **seconda** volta.
- 12 Con una pipetta multicanale P20 impostata a 20 µl rimuovere l'eccesso di EtOH.
- 13 Rimuovere la piastra CLP dal supporto magnetico e asciugare all'aria le microsfere per 10 minuti.
- 14 Dispensare 30 µl di tampone di eluizione in ogni campione.
- 15 Sigillare la piastra CLP e agitare su uno shaker per micropiastre a 1.800 giri/min per due minuti. Dopo aver agitato, controllare che i campioni siano risospesi. Altrimenti, ripetere questo passaggio.
- 16 Incubare a temperatura ambiente per due minuti.
- 17 Mettere la piastra CLP sul supporto magnetico e attendere che il surnatante diventi limpido (circa due minuti).
- 18 Etichettare una nuova piastra MIDI LNP.
- 19 Trasferire 20 µl di surnatante da ciascun pozzetto della piastra CLP al corrispondente pozzetto della piastra LNP.
- 20 **[Facoltativo]** Trasferire i restanti 10 µl di surnatante dalla piastra CLP a una nuova piastra ed etichettare la piastra con il nome e la data della corsa. Conservare questa piastra a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C fino al completamento della corsa di sequenziamento e dell'analisi dei dati. I prodotti della PCR puliti possono essere usati per risolvere eventuali problemi a carico dei campioni.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se ci si ferma a questo punto, sigillare la piastra LNP e centrifugare a 1.000 × g a 20 °C per un minuto. La piastra è stabile per un massimo di tre ore a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

Normalizzazione e raggruppamento in pool delle librerie

Materiali di consumo

- ▶ Provetta conica da 15 ml
- ▶ Piastra per PCR a 96 pozzetti
- ▶ Provette per microcentrifuga
- ▶ Microsfere della libreria
- ▶ Tampone di diluizione libreria
- ▶ Diluente di normalizzazione della libreria
- ▶ Lavaggio di normalizzazione della libreria
- ▶ 10 N di NaOH
- ▶ Acqua priva di DNasi/RNasi

Preparazione

- 1 Preparare i seguenti materiali di consumo:

Reagente	Conservazione	Istruzioni
Microsfere della libreria	tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.
Tampone di diluizione libreria	tra -25 °C e -15 °C	Portare a temperatura ambiente. Agitare vigorosamente. Assicurarsi che tutti i precipitati siano disciolti.

Reagente	Conservazione	Istruzioni
Diluyente di normalizzazione della libreria	tra -25 °C e -15 °C	Portare a temperatura ambiente. Agitare vigorosamente. Assicurarsi che tutti i precipitati siano disciolti.
Lavaggio di normalizzazione della libreria	tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente. Agitare vigorosamente.

- Preparare al momento 0,1 N di NaOH dispensando 50 µl di 10 N di NaOH a 4.950 µl di acqua priva di RNasi/DNasi.

Procedura

- Miscelare il diluyente di normalizzazione della libreria e le microsfere della libreria in una provetta conica nuova da 15 ml nel modo seguente.



NOTA

Le istruzioni seguenti includono i volumi richiesti per elaborare 96 campioni. Se viene analizzato un numero inferiore di campioni, regolare di conseguenza i volumi per preservare i reagenti.

- Per 96 campioni, dispensare 4,4 ml di diluyente di normalizzazione della libreria.
- Agitare le microsfere della libreria energicamente per un minuto con inversione intermittente fino a risospensione delle microsfere e assenza di pellet sul fondo della provetta quando quest'ultima viene capovolta.
- Pipettare le microsfere della libreria su e giù 10 volte per risospenderle.



ATTENZIONE

È fondamentale risospendere completamente il pellet delle microsfere della libreria in fondo alla provetta. L'uso di una punta P1000 garantisce che le microsfere vengano risospese in modo omogeneo e che non vi sia massa di microsfere sul fondo della provetta. Questo è fondamentale per ottenere una densità cluster omogenea sulla cella a flusso.

- Per 96 campioni, pipettare 800 µl di microsfere della libreria nella provetta conica contenente il diluyente di normalizzazione della libreria.
 - Miscelare capovolgendo la provetta 15-20 volte.
- Dispensare 45 µl della soluzione di lavoro combinata di diluyente di normalizzazione della libreria/microsfere della libreria in ogni pozzetto della piastra LNP.
 - Sigillare la piastra LNP e agitare su uno shaker per micropiastre a 1.800 giri/min per 30 minuti.



NOTA

Se il sequenziamento verrà effettuato il giorno stesso, iniziare lo scongelamento della cartuccia di reagenti. Attenersi alle istruzioni relative allo scongelamento della cartuccia di reagenti MiSeqDx contenute nella sezione *Preparazione per il sequenziamento delle librerie a pagina 31*.

- Mettere la piastra LNP sul supporto magnetico e attendere che il liquido diventi limpido (circa due minuti).
- Lasciando la piastra LNP sul supporto magnetico, rimuovere attentamente il sumatante e smaltirlo.
- Rimuovere la piastra LNP dal supporto magnetico e lavare le microsfere con il lavaggio di normalizzazione della libreria nel modo seguente:
 - Dispensare 45 µl di lavaggio di normalizzazione della libreria in ogni pozzetto contenente il campione.
 - Sigillare la piastra LNP e agitare su uno shaker per micropiastre a 1.800 giri/min per cinque minuti.
 - Posizionare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di due minuti o finché il sumatante è limpido.
 - Rimuovere attentamente e smaltire il sumatante.
- Ripetere la procedura di lavaggio di normalizzazione della libreria come descritto nella fase precedente.

- 8 Utilizzare una pipetta multicanale P20 impostata su 20 µl per rimuovere l'eccesso di lavaggio di normalizzazione della libreria.
- 9 Rimuovere la piastra LNP dal supporto magnetico e dispensare 30 µl di 0,1 N di NaOH in ogni pozzetto.
- 10 Sigillare la piastra LNP e agitare su uno shaker per micropiastre a 1.800 giri/min per cinque minuti.
- 11 Durante l'eluizione di cinque minuti, etichettare una nuova piastra SGP per PCR a 96 pozzetti.
- 12 Dispensare 30 µl di tampone di conservazione della libreria in ogni pozzetto.
- 13 Assicurarsi che tutti i campioni nella piastra LNP siano completamente risospesi. Se i campioni non sono completamente risospesi, pipettare delicatamente i campioni su e giù oppure picchiettare delicatamente la piastra sul banco, quindi agitare per altri cinque minuti.
- 14 Posizionare la piastra LNP sul supporto magnetico per un minimo di due minuti.
- 15 Utilizzando una pipetta multicanale impostata su 30 µl, trasferire il sumatante dalla piastra LNP alla piastra SGP. Pipettare delicatamente su e giù cinque volte per miscelare.
- 16 Sigillare la piastra SGP, quindi centrifugare a 1.000 × g a 20 °C per un minuto.
- 17 Agitare il tampone di diluizione della libreria e assicurarsi che tutti i precipitati si siano disciolti completamente. Centrifugare brevemente per raccogliere i contenuti.
- 18 Etichettare una nuova provetta PAL per microcentrifuga.
- 19 Determinare i campioni da raggruppare in pool per il sequenziamento. Per il sequenziamento è possibile utilizzare al massimo 96 campioni contemporaneamente.
- 20 Trasferire 5 µl di ciascuna libreria da sequenziare da ogni pozzetto della piastra SGP, colonna per colonna, al corrispondente pozzetto della striscia a otto provette per PCR.
- 21 Trasferire il contenuto della striscia a otto provette per PCR nella provetta PAL. Agitare su un vortex la provetta PAL fino a completa miscelazione.
- 22 Sigillare la piastra SGP con un sigillo adesivo per piastra ed etichettarla con il nome e la data della corsa.

**NOTA**

La piastra SGP può essere conservata a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di tre giorni e utilizzata, se necessario, per raggruppare nuovamente in pool le librerie.

- 23 Etichettare 2-3 nuove provette DAL per microcentrifuga.
- 24 Dispensare 585 µl di tampone di diluizione della libreria nelle provette DAL.
- 25 Trasferire 9 µl di PAL in ogni provetta DAL contenente il tampone di diluizione libreria.
- 26 Pipettare su e giù per 3-5 volte per sciacquare la punta e assicurare che il trasferimento sia completo.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se non si procede immediatamente al sequenziamento su MiSeqDx, le provette DAL possono essere conservate a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 28 giorni.

Sequenziamento delle librerie**NOTA**

Il flusso di lavoro per il sequenziamento delle librerie è identico sia per il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant che per il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing.

Preparazione per il sequenziamento delle librerie**Materiali di consumo**

- ▶ MiSeqDx Reagent Kit v3
- ▶ Tampone di diluizione libreria
- ▶ Libreria di campione di controllo interno PhiX

Preparazione

- 1 **Predisporre un blocco termico adatto a centrifugare provette da 1,5 ml a 96 °C.**
- 2 **In un portaggiaccio, preparare un bagno d'acqua e ghiaccio.**
- 3 **Preparare i seguenti materiali di consumo:**

Reagente	Conservazione	Istruzioni
Tampone di diluizione libreria	tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente. Utilizzare un vortex per miscelare. Assicurarsi che tutti i precipitati siano disciolti. Centrifugare brevemente e posizionare in un bagno d'acqua e ghiaccio. Se necessario, MiSeqDx Reagent Kit v3 contiene ulteriore tampone di diluizione della libreria.
Campione di controllo interno PhiX	tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente. Mettere in un bagno d'acqua e ghiaccio.
Cartuccia MiSeqDx Reagent Kit v3	tra -25 °C e -15 °C	Lasciare la cartuccia di reagenti a scongelare nel bagno d'acqua a temperatura ambiente per circa 90 minuti o fino a completo scongelamento. Per maggiori informazioni sulla preparazione della cartuccia di reagenti, vedere la Guida di consultazione dello strumento MiSeqDx per MOS v2 (documento n. 1000000021961).
Cella a flusso MiSeqDx	tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente. Per maggiori informazioni sulla preparazione della cella a flusso, vedere la Guida di consultazione dello strumento MiSeqDx per MOS v2 (documento n. 1000000021961).
MiSeqDx SBS Solution (PR2)	tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente. Per maggiori informazioni sulla preparazione della soluzione SBS, vedere la Guida di consultazione dello strumento MiSeqDx per MOS v2 (documento n. 1000000021961).

Denaturazione e diluizione del campione di controllo interno PhiX

Materiali di consumo

- ▶ Acqua priva di DNasi/RNasi
- ▶ 10 N di NaOH
- ▶ Tampone di diluizione libreria
- ▶ Libreria di campione di controllo interno PhiX
- ▶ Tampone TE
- ▶ Provetta conica da 15 ml
- ▶ Provette per microcentrifuga

Preparazione

- 1 **Preparare 0,1 N di NaOH combinando i seguenti volumi in una provetta conica:**
 - ▶ Acqua priva di DNasi/RNasi (2.475 µl)
 - ▶ 10 N di NaOH standard (25 µl)
- 2 **Capovolgere la provetta diverse volte per miscelare.**



ATTENZIONE

L'utilizzo di una soluzione preparata al momento di NaOH diluito è essenziale per denaturare completamente i campioni in vista della generazione di cluster su MiSeqDx.

Se PhiX viene preparato lo stesso giorno della normalizzazione della libreria, è possibile utilizzare la stessa quantità di 0,1 N di NaOH standard.

- 3 **Combinare i seguenti volumi per diluire la libreria del campione di controllo interno PhiX da 2 nM:**
 - ▶ 10 nM di libreria del campione di controllo interno PhiX (2 µl)
 - ▶ 1X di tampone TE (8 µl)

- 4 Combinare i seguenti volumi per preparare una libreria del campione di controllo interno PhiX da 1 nM:
 - ▶ 2 nM di libreria del campione di controllo interno PhiX (10 µl)
 - ▶ 0,1 N di NaOH (10 µl)
- 5 Utilizzare brevemente un vortex per miscelare.
- 6 Centrifugare il campione di controllo interno PhiX da 1 nM a 280 × g a 20 °C per un minuto.
- 7 Incubare per cinque minuti a temperatura ambiente per denaturare la soluzione della libreria del campione di controllo interno PhiX in filamenti singoli.
- 8 In una nuova provetta per centrifuga, combinare i seguenti volumi per preparare una libreria del campione di controllo interno PhiX da 20 pM:
 - ▶ Libreria del campione di controllo interno PhiX denaturata (2 µl)
 - ▶ Tampone di diluizione libreria pre-raffreddato (98 µl)

**ATTENZIONE**

La libreria del campione di controllo interno PhiX da 20 pM denaturata può essere conservata per un massimo di tre settimane a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C sotto forma di aliquote monouso.

Preparazione dei campioni per il sequenziamento

- 1 Preparare una provetta DAL per il sequenziamento.
- 2 Se la provetta DAL è stata conservata congelata, scongelarla completamente e miscelarla pipettando su e giù.
- 3 Se 20 pM di campione di controllo interno PhiX sono stati conservati congelati, rimuovere la singola aliquota da utilizzare, scongelarla completamente, quindi centrifugare brevemente.
- 4 Dispensare 6 µl di campione di controllo interno PhiX da 20 pM nella provetta DAL.
- 5 Pipettare su e giù per 3-5 volte per sciacquare la punta e assicurare che il trasferimento sia completo.
- 6 Mescolare la provetta della DAL con un agitatore vortex a velocità massima.
- 7 Centrifugare la provetta DAL a 1.000 × g a 20 °C per un minuto.
- 8 Incubare la provetta DAL in un blocco termico a 96 °C per due minuti.
- 9 Dopo l'incubazione, capovolgere la provetta DAL 1-2 volte per miscelarla, quindi porla immediatamente in un bagno d'acqua e ghiaccio.
- 10 Tenere la provetta DAL (librerie raggruppate in pool) nel bagno d'acqua e ghiaccio per cinque minuti.

Caricamento delle librerie raggruppate in pool sulla cartuccia

- 1 Utilizzare una nuova punta per pipette 1 ml per forare il sigillo sopra il serbatoio sulla cartuccia di reagenti contrassegnato con la dicitura Load Samples (Carica campioni).
- 2 Pipettare 600 µl dalla provetta DAL nel serbatoio contrassegnato con la dicitura Load Samples (Carica campioni). Evitare di toccare il sigillo.
- 3 Una volta caricato il campione, verificare la presenza di bolle d'aria nel serbatoio. In caso di presenza di bolle d'aria, picchiare delicatamente la cartuccia sul banco in modo da farle fuoriuscire.
- 4 Passare direttamente alla procedura d'impostazione della corsa utilizzando l'interfaccia di MiSeq Operating Software (MOS). Per maggiori informazioni sull'impostazione di una corsa su MiSeqDx, vedere la *Guida di consultazione dello strumento MiSeqDx per MOS v2 (documento n. 1000000021961)*.

Lavaggio post-corsa con lavaggio della linea del template

Al termine del sequenziamento è vivamente raccomandato un lavaggio post-corsa con lavaggio della linea del template.

**ATTENZIONE**

Il mancato lavaggio della linea del template può influire sui tassi di identificazioni dei controlli negativi.



NOTA

Il flusso di lavoro per il lavaggio post-corsa è identico sia per il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant che per il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing.

Materiali di consumo

- ▶ Provette per microcentrifuga
- ▶ Acqua da laboratorio
- ▶ Tween 20
- ▶ Ipoclorito di sodio al 5%
- ▶ Provetta MiSeq



AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene materiali chimici potenzialmente pericolosi. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare l'attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumento da laboratorio appropriato per evitare i rischi di esposizione. Manipolare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni applicabili a livello regionale, nazionale e locale. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS alla pagina Web support.illumina.com/sds.html.

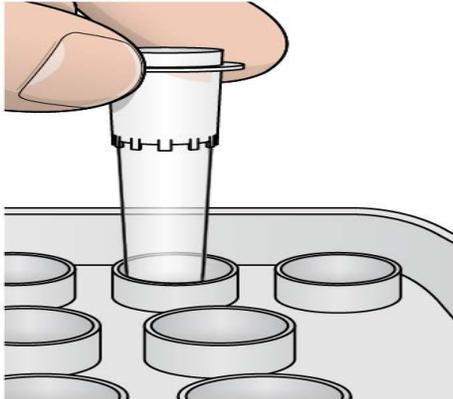
Preparazione

- 1 Preparare al momento una soluzione di lavaggio con Tween 20 e acqua da laboratorio nel seguente modo.
 - a Dispensare 5 ml di Tween 20 al 100% a 45 ml di acqua da laboratorio. Con questi volumi si otterrà Tween 20 al 10%.
 - b Dispensare 25 ml di Tween 20 al 10% a 475 ml di acqua da laboratorio. Con questi volumi si otterrà una soluzione di lavaggio Tween 20 allo 0,5%.
 - c Capovolgere cinque volte per miscelare.
- 2 Preparare al momento una soluzione di lavaggio di ipoclorito di sodio con acqua da laboratorio nel modo seguente.
 - a Dispensare 36 µl di ipoclorito di sodio al 5% a 864 µl di acqua da laboratorio. Questi volumi forniscono una diluizione di ipoclorito di sodio di 1:25.
 - b Dispensare in una provetta MiSeq 50 µl di diluizione di ipoclorito di sodio di 1:25 a 950 µl di acqua da laboratorio.
- 3 È importante utilizzare una concentrazione corretta di ipoclorito di sodio. Assicurarsi di verificare la percentuale di ipoclorito di sodio sull'etichetta del prodotto. Se la concentrazione è troppo alta, potrebbe impedire la generazione di cluster nelle corse successive. Se non è disponibile ipoclorito di sodio al 5%, preparare una soluzione di 1 ml di ipoclorito di sodio allo 0,01% in acqua da laboratorio. Non usare ipoclorito di sodio per un lavaggio di manutenzione o un lavaggio di standby.
- 4 Preparare al momento i componenti di lavaggio con soluzione di lavaggio nel modo seguente.
 - a Dispensare 6 ml di soluzione di lavaggio a ciascun serbatoio del vassoio di lavaggio.
 - b Dispensare 350 ml di soluzione di lavaggio al flacone di lavaggio da 500 ml.

Procedura

- 1 Inserire la provetta MiSeq contenente la soluzione di lavaggio di ipoclorito di sodio allo 0,01% nella posizione 17 del vassoio di lavaggio fino a quando il collo della provetta è allineato con il vassoio. La provetta sposta la soluzione di lavaggio composta da Tween 20 e acqua da laboratorio nella posizione 17.

Figura 2 Provetta MiSeq nella posizione 17 del vassoio di lavaggio

**ATTENZIONE**

Assicurarsi di inserire la provetta MiSeq con ipoclorito di sodio solo nella posizione 17 del vassoio. Se la provetta viene inserita in un'altra posizione potrebbe causare la mancata generazione di cluster nelle corse successive.

- 2 Al termine della corsa, selezionare **Start Wash** (Avvia lavaggio). Il software solleva automaticamente i pescanti nel vano refrigerato per i reagenti.
- 3 Selezionare **Perform optional template line wash** (Esegui un lavaggio facoltativo della linea del template) sulla schermata Post-Run Wash (Lavaggio post-corsa).
- 4 Aprire lo sportello dello scomparto reagenti e lo sportello del vano refrigerato per i reagenti e far scorrere la cartuccia di reagenti usata dal vano refrigerato.
- 5 Far scorrere il vassoio di lavaggio all'interno del vano refrigerato per i reagenti finché non si arresta in posizione, quindi chiudere lo sportello del vano refrigerato.
- 6 Sollevare la maniglia del pettine di aspirazione di fronte al flacone di MiSeqDx SBS Solution e al flacone degli scarti finché non si blocca in posizione.
- 7 Rimuovere il flacone di MiSeqDx SBS Solution e sostituirlo con un flacone di lavaggio.
- 8 Rimuovere il flacone degli scarti ed eliminarne il contenuto seguendo le opportune procedure di smaltimento. Riposizionare il flacone degli scarti nello scomparto reagenti.
- 9 Abbassare lentamente la maniglia del pettine di aspirazione. Accertarsi che i pescanti vengano abbassati nel flacone di lavaggio e nel flacone degli scarti.
- 10 Chiudere lo sportello dello scomparto reagenti.
- 11 Selezionare **Next** (Avanti). Il lavaggio post-corsa ha inizio.
- 12 Dopo il completamento del lavaggio, lasciare sullo strumento la cella a flusso usata, il vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio contenente la soluzione di lavaggio residua.
- 13 I pescanti rimangono nella posizione abbassata, il che è normale. Lasciare la soluzione di lavaggio non utilizzata nel vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio per evitare che i pescanti si asciughino e che entri aria nel sistema.

Rianalisi delle librerie sequenziate

Dopo una corsa di sequenziamento, è possibile rianalizzare lo stesso set di dati di sequenziamento attenendosi alla procedura *Rimessa in coda dell'analisi* della Guida di consultazione del software *Local Run Manager Software per MiSeqDx* (documento n. 1000000011880). La rimessa in coda dell'analisi è limitata al modulo inizialmente utilizzato per eseguire il sequenziamento. La rimessa in coda dell'analisi consente di modificare le informazioni sui campioni e di generare nuovi report.



NOTA

Le librerie raggruppate in pool utilizzate per il sequenziamento devono avere 24-96 campioni. Per ottenere i report di un sotto gruppo di campioni immettere un numero inferiore di campioni durante l'impostazione della rimessa in coda. I report verranno generati solo per i campioni immessi durante l'impostazione della rimessa in coda.

Opzioni di rianalisi per le librerie raggruppate in pool

Il saggio TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant utilizza lo stesso flusso di lavoro per la preparazione delle librerie e gli stessi reagenti del saggio TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing. Prima di avviare la procedura di preparazione delle librerie è necessario selezionare un saggio. Tuttavia, nei casi in cui le librerie raggruppate in pool (provette DAL) richiedano ulteriore analisi (ad esempio la ripetizione di un corsa di sequenziamento o un test reflex con un altro saggio TruSight CF), le provette DAL possono essere utilizzate in base a necessità senza ripetere la preparazione delle librerie. Per la rianalisi attenersi alle procedura seguente:



NOTA

Le librerie raggruppate in pool utilizzate per il sequenziamento devono avere almeno 24-96 campioni. Per ottenere i report di un sotto gruppo di campioni immettere un numero inferiore di campioni durante l'impostazione della corsa di sequenziamento. Tutti i campioni raggruppati in pool verranno sequenziati, ma i report verranno generati solo per i campioni immessi durante l'impostazione della corsa di sequenziamento.

- 1 Impostare la corsa attenendosi alle istruzioni contenute in *Selezione del saggio e impostazione della corsa a pagina 20*.
- 2 Sequenziare le librerie attenendosi alle istruzioni contenute in *Sequenziamento delle librerie a pagina 31*.
- 3 Al termine della corsa di sequenziamento, lavare MiSeqDx attenendosi alle istruzioni contenute in *Lavaggio post-corsa con lavaggio della linea del template a pagina 33*.

Interpretazione dei risultati del saggio Cystic Fibrosis 139-Variant

- ▶ Il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant è progettato per rilevare le 139 varianti del gene CFTR, incluse quelle raccomandate dall'ACMG (*Tabella 2*).
- ▶ Il report del saggio elenca i nomi dei campioni e il genotipo per ciascuna variante rilevata per un campione.
 - ▶ Tutti i campioni sono interrogati per le 134 varianti che causano la fibrosi cistica e la variante R117H. Nel report del saggio sono elencate solo gli alleli mutanti rilevati.
 - ▶ La variante PolyTG/PolyT viene riportata solo se la variante R117H viene identificata per un campione. Per i pazienti con una variante R117H, vengono eseguiti ulteriori test per determinare se una variante PolyTG/PolyT, che può incidere sul fenotipo clinico [ad. es., 12-13 (TG) o 5T] è in orientamento cis/trans sulla variante R117H.



NOTA

Il genotipo PolyTG/PolyT viene determinato dal saggio Cystic Fibrosis 139-Variant in base al conteggio delle letture dei genotipi più comuni. Grazie alla natura digitale del sequenziamento di nuova generazione, il saggio è in grado di raggiungere elevata accuratezza mediante osservazioni multiple rispetto a altre tecnologie basate sul sequenziamento che usano solo poche osservazioni.

- ▶ Quando un campione presenta il genotipo omozigote F508del o I507del, se sono rilevati uno o più dei tre polimorfismi benigni I506V, I507V e F508C, questo viene riportato per il campione. Se tutti e tre i polimorfismi sono wild type, il report indica che le varianti I506V, I507V e F508C non sono presenti per il campione.

**NOTA**

Poiché questo è un saggio basato sul sequenziamento, non ci sono interferenze nel riportare F508del o I507del dovute ai tre polimorfismi benigni. Pertanto, non verranno eseguite correzioni sul risultato rilevato.

- ▶ Il risultato del genotipo è riportato come HET (eterozigote) quando un campione è identificato come eterozigote e per il campione sono stati rilevati sia wild type che alleli mutanti.
- ▶ Il risultato del genotipo è riportato come HOM (omozigote) quando un campione è identificato come omozigote e per il campione è rilevato solo l'allele mutante.
- ▶ Se per un campione non viene identificata alcuna variante, il report indica No panel variants are detected (Non è stata rilevata alcuna variante per il pannello).
- ▶ Il report del saggio fornisce informazioni sulla percentuale di identificazione dei campioni per ciascun campione. La percentuale di identificazione è calcolata come il numero di posizioni/regioni della variante che corrisponde a un valore di soglia di affidabilità predefinito per il numero totale di posizioni/regioni interrogate.
 - ▶ Per i campioni che richiedono report condizionale, anche le varianti aggiuntive interrogate sono usate per il calcolo della percentuale di identificazione.
 - ▶ Qualsiasi variante con un valore di affidabilità predefinito inferiore alla soglia viene riportato come No call (Nessuna identificazione). Si raccomanda di ripetere il campione.
- ▶ Il risultato ottenuto viene considerato valido solo se la percentuale di identificazione è $\geq 99\%$. Se la percentuale di identificazione è inferiore a 99%, la prestazione verrà riportata come Fail (Non superato) e il campione deve essere ripetuto.

**NOTA:**

Se la percentuale di identificazione del campione è inferiore a 50%, la prestazione verrà riportata come Fail (Non superato) e il commento Sample Failed (Campione non superato) verrà indicato nel report. Le informazioni sulle varianti non vengono visualizzate. Questo campione deve essere ripetuto.

- ▶ Si raccomanda all'utente di verificare le varianti convalidate usando campioni sintetici (vedere la tabella Accuratezza) usando un metodo di riferimento convalidato prima di riportare il primo risultato del paziente con quelle varianti.
- ▶ Se per un campione vengono identificate più di due varianti, si raccomanda di verificare il risultato ripetendo il campione usando il saggio TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant con gDNA estratto fresco per escludere la contaminazione incrociata del campione.

**NOTA**

Quando vengono rilevate due o più varianti deve essere presa in considerazione la determinazione delle fasi (phasing) per l'aplotipo.

- ▶ Tutte le interpretazioni devono essere eseguite da un genetista clinico molecolare certificato o equivalente attenendosi alle procedure e alle linee guida locali.¹⁵ I possibili riferimenti per l'interpretazione includono, ma non sono limitati a: database CFTR2,¹¹ classificazione di Sosnay,¹³ linee guida del 2004 dell'ACMG¹ e le opinioni 2011 della commissione ACOG.² Per informazioni su come vengono calcolati e presentati i risultati o per una descrizione del contenuto del file di testo del report, fare riferimento alle guide per i software di analisi installati su MiSeqDx. Per Local Run Manager, vedere la *Guida di consultazione del software Local Run Manager per MiSeqDx (documento n. 100000011880)* e la *Guida al flusso di lavoro del modulo di analisi CF 139-Variant 2.0 per Local Run Manager (documento n. 1000000100945)*.

Interpretazione dei risultati del saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing è progettato per sequenziare tutte le regioni codificanti le proteine nel gene CFTR su 27 esoni, 5-30 basi di sequenza intronica fiancheggiante, circa 100 nt di sequenza fiancheggiante le regioni non tradotte (UTR) 5' e 3' e due mutazioni introniche profonde (1811+1.6kbA>G,

3489+10kbC>T). Le regioni esatte sequenziate sono indicate nella **Tabella 3**. Inoltre il saggio riporta la variante PolyTG/PolyT e due delezioni ampie (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23).

- ▶ Il report del saggio elenca i nomi dei campioni e il genotipo per ciascuna variante rilevata per un campione.
 - ▶ Per ciascuna variante sono riportati la coordinata genomica, il nome cDNA della Human Genome Variation Society (HGVS) e il nome della proteina (se disponibile).
 - ▶ Il tipo di variante è identificata come una variante di singolo nucleotide (SNV), una variante di delezione/inserzione (DIV), una variante PolyTG/PolyT (PolyTGPolyT) o una delezione ampia (DEL).
 - ▶ L'identificazione dei genotipi (eterozigoti od omozigoti) può essere dedotta dalle informazioni della base di "riferimento", che forniscono la sequenza di riferimento a quella coordinata genomica, e la descrizione del "risultato" che fornisce i due alleli alla posizione genomica nel campione. Ad esempio, se Reference (Riferimento) è G e Result (Risultato) è A/G, questo indica un cambiamento G>A a quella coordinata genomica e che il genotipo è eterozigote per l'allele della variante. Nello stesso modo, se Reference (Riferimento) è G e Result (Risultato) è T/T, questo indica un cambiamento G>T a quella coordinata genomica e che il genotipo è omozigote per l'allele della variante.
 - ▶ La profondità di sequenziamento alla posizione della variante è fornita nel campo Depth (Profondità) e la frequenza allelica nella sezione Frequency (Frequenza).
- ▶ Il report del saggio fornisce informazioni sulla percentuale di identificazione dei campioni per ciascun campione. La percentuale di identificazione è calcolata come il numero di posizioni/regioni della variante che corrisponde a un valore di soglia di affidabilità predefinito per il numero totale di posizioni/regioni interrogate.
 - ▶ La coordinata genomica per qualsiasi posizione o regione per la quale il valore di affidabilità è inferiore alla soglia è elencato separatamente nella sezione Coordinates not called (Coordinate non identificate). Gli utenti devono valutare le posizioni non identificate rispetto alle informazioni rilevanti sulla variante per identificare le varianti che possono essere state non identificate rispetto alle frequenze della popolazione corrispondenti per determinare se è necessario ripetere il campione.
- ▶ Il risultato ottenuto viene considerato valido solo se la percentuale di identificazione è $\geq 99\%$. Se la percentuale di identificazione è inferiore a 99%, la prestazione verrà riportata come Fail (Non superato) e il campione deve essere ripetuto.
- ▶ Si raccomanda all'utente di verificare qualsiasi variante che non rientra in ciò che è stato convalidato nello studio di accuratezza (vedere **Accuratezza a pagina 60**) usando un metodo di riferimento convalidato prima di creare un report per il primo risultato del paziente con quelle varianti.
 - ▶  Quando vengono rilevate due o più varianti deve essere presa in considerazione la determinazione delle fasi (phasing) per l'aplotipo.
- ▶ Tutte le interpretazioni delle varianti devono essere eseguite da un genetista molecolare certificato o equivalente attenendosi alle procedure e linee guida locali¹⁵. I possibili riferimenti per l'interpretazione includono, ma non sono limitati a: database CFTR2^{11,12}, classificazione di Sosnay¹³, linee guida 2004 dell'ACMG¹ e opinione 2011 della commissione ACOG².

Per informazioni sul modo in cui i risultati sono calcolati e presentati o per una descrizione dei contenuti del file di testo del report, vedere le guide per i software di analisi installati con MiSeqDx. Per Local Run Manager vedere la *Guida di consultazione del software Local Run Manager per MiSeqDx (documento n. 100000011880)* e la *Guida al flusso di lavoro del modulo di analisi CF Clinical Seq 2.0 per Local Run Manager (documento n. 1000000100946)*.
- ▶ Il genetista utilizzerà il software Local Run Manager per immettere un valore di interpretazione per ciascuna variante riportata su un campione usando un menu a discesa. I valori di interpretazione sono: CF-causing (Che causa la fibrosi cistica), Mutation of varying clinical consequence (Mutazione di varie conseguenze chimiche), Mutation of unknown significance (Mutazione con significato sconosciuto) o Non-CF causing (Che non causa la fibrosi cistica). Il valore immesso verrà aggiunto al file dei risultati e visualizzato nella colonna delle interpretazioni sul report del saggio Clinical Sequencing.

Procedure per il controllo qualità

Le buone pratiche di laboratorio impongono che i materiali di controllo siano valutati per rilevare le differenze nell'elaborazione dei campioni di sangue e nelle procedure tecniche nel laboratorio dell'utente che potrebbero produrre una variabilità significativa nei risultati.

- **Controllo negativo (NTC o No Template Control):** l'uso di un controllo negativo è richiesto su ogni corsa per rilevare possibili incidenze di contaminazione. La percentuale di identificazione per il controllo negativo deve essere inferiore al 10%. Se un controllo negativo genera una percentuale di identificazione inferiore al 10% e il lavaggio della linea del template era stato eseguito per la corsa precedente, potrebbe essersi verificata una contaminazione durante l'elaborazione del saggio. Il saggio viene considerato non riuscito e deve essere ripetuto completamente, a partire dalla preparazione delle librerie. Il campione di controllo negativo viene riportato come Pass (Superato) se genera una percentuale di identificazione di $\leq 10\%$ e Fail (Non superato) se la percentuale di identificazione è inferiore al 10%.



NOTA

È fondamentale eseguire il lavaggio della linea del template dopo ogni corsa di sequenziamento per evitare di ottenere percentuali di identificazione elevate del controllo negativo. Se la percentuale di identificazione del controllo negativo è inferiore al 10% e nella corsa precedente non è stato eseguito il lavaggio della linea del template, si raccomanda all'operatore di completare un lavaggio post-corsa con un lavaggio della linea del template e ripetere la corsa di sequenziamento.

- **Controlli positivi:** un campione di DNA di controllo positivo è richiesto su tutte le corse. Il campione di DNA di controllo positivo deve essere un campione ben caratterizzato e con almeno una variante nota del gene CFTR.¹⁶ Illumina raccomanda di utilizzare i controlli positivi in rotazione coerenti con le linee guida e gli standard tecnici 2008 dell'ACMG per l'analisi delle mutazioni della fibrosi cistica¹⁷ e gli standard di laboratorio 2013 dell'ACMG per il sequenziamento di nuova generazione.¹⁸ Il campione di controllo positivo deve generare il genotipo previsto. Se il controllo positivo genera un genotipo diverso da quello previsto significa che si è verificato un errore nel monitoraggio del campione oppure una registrazione errata dei primer di indicizzazione. Il saggio deve essere ripetuto completamente a partire dalla preparazione delle librerie. Il campione di controllo positivo viene riportato come Pass (Superato) se genera una percentuale di identificazione di $\geq 99\%$ e Fail (Non superato) se la percentuale di identificazione è inferiore al 99%.
- **Controllo wild type:** il campione di DNA di controllo wild type è raccomandato in tutte le corse. Il campione di controllo wild type deve essere un campione ben caratterizzato che non contiene nessuna variante del gene CFTR. Il campione di controllo wild type deve generare il genotipo previsto. Se il controllo wild type genera un genotipo diverso da quello previsto significa che si è verificato un errore nel monitoraggio del campione oppure una registrazione errata dei primer di indicizzazione. Il saggio deve essere ripetuto completamente a partire dalla preparazione delle librerie.
- Il risultato ottenuto viene considerato valido solo se la percentuale di identificazione è $\geq 99\%$. Se la percentuale di identificazione è inferiore a 99%, la prestazione verrà riportata come Fail (Non superato) e il campione deve essere ripetuto.
- Prima di iniziare a usare questo prodotto nel laboratorio dell'utente, verificare le prestazioni del saggio testando un numero di campioni positivi e negativi con caratteristiche delle prestazioni note.
- Tutti i requisiti di controllo qualità devono essere eseguiti in conformità alle normative locali, statali e/o federali o ai requisiti di accreditamento.

Caratteristiche delle prestazioni per il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant

Le caratteristiche delle prestazioni del saggio Cystic Fibrosis 139-Variant sono basati su studi che utilizzano il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant. L'equivalenza tra i saggi TruSight e MiSeqDx sono forniti in *Equivalenza delle prestazioni con il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina a pagina 59.*

Accuratezza

L'accuratezza del saggio Cystic Fibrosis 139-Variant è stata stimata valutando 500 campioni che rappresentano un'ampia gamma di varianti del gene CFTR da quattro fonti separate. La fonte principale dei dati di accuratezza è stato uno studio di accuratezza clinica condotto usando un pannello di 366 campioni. La maggior parte (n=355) dei campioni consistevano di campioni clinici di gDNA archiviati e resi anonimi isolati da sangue umano. I restanti 11 campioni sono stati ottenuti da campioni di linee cellulari disponibili in commercio.

I dati di questo studio sono stati integrati con i dati di accuratezza ottenuti da 68 campioni di linee cellulari nello studio di riproducibilità, 14 campioni clinici ottenuti dallo studio di valutazione analitica del metodo di estrazione e 52 campioni di plasmidi sintetici. I plasmidi sintetici sono stati progettati per includere il contesto genomico di varianti rare e contenuti ovunque da una a nove varianti entro lo stesso costrutto. Sono stati linearizzati, diluiti a numero di copie equivalenti di DNA genomico e miscelati con campioni di DNA genomico umano di genotipo wild type a numero di copie equivalenti per imitare un campione eterozigote.

I risultati di genotipizzazione per 137 siti di SNV/piccole Indel, inclusa la regione PolyTG/PolyT, sono stati confrontati con l'analisi bidirezionale delle sequenze di Sanger. Sono stati usati due saggi convalidati basati sulla PCR come metodo di riferimento per due ampie delezioni nel pannello. Ciascun saggio PCR in duplex ha utilizzato due gruppi di primer per discriminare tra genotipi wild type, eterozigote e omozigote. Uno dei gruppi di primer è stato progettato per fiancheggiare i breakpoint delle delezioni, mentre l'altro gruppo ha amplificato una regione interna alla delezione. I due prodotti sono stati rilevati mediante separazione in base alla dimensione su un gel di agarosio.

I saggi PCR sono stati convalidati usando un pannello di 28 campioni (22 campioni per ciascuna delezione) che consiste di campioni di DNA genomico di linee cellulari e derivati dal sangue e plasmidi sintetici, che hanno incluso i genotipi WT, HET e HOM per ciascuna ampia delezione. È stato confermato che i saggi PCR presentano una specificità e una riproducibilità del 100% per tutti i campioni testati, mediante la valutazione dei prodotti della PCR su un gel di agarosio. L'accuratezza dei saggi PCR è stata confermata usando il sequenziamento Sanger ed è stata del 100% per tutti i campioni.

L'accuratezza è stata determinata per ogni genotipo attraverso tre misurazione statistiche. La concordanza positiva (Positive Agreement, PA) è stata calcolata per ciascun genotipo di variante dividendo il numero di campioni con identificazioni di varianti concordanti per il numero totale di campioni con detta variante come identificato dai metodi di riferimento. La concordanza negativa (Negative Agreement, NA) è stata calcolata su tutte le posizioni wild type (WT) dividendo il numero di posizioni WT concordanti per il numero totale di posizioni WT come definito dai metodi di riferimento. La concordanza complessiva (Overall Agreement, OA) è stata calcolata su tutte le posizioni riportate dividendo il numero di posizioni di WT e delle varianti concordanti per il numero totale di posizioni riportate determinato in base ai metodi di riferimento.

Il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant presenta una concordanza positiva (PA) a livello di genotipo del 100%. La concordanza negativa (NA) per tutte le posizioni WT superava il 99,99% e la concordanza complessiva (OA) per tutte le posizioni riportate superava il 99,99%. Tutti i risultati del test sono basati su test iniziali.

Tabella 14 Accuratezza complessiva del saggio Cystic Fibrosis 139-Variant

Variante (nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identifi- cazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identifi- cazioni negative (wild type)	N. di mancate identifi- cazioni	N. di identifi- cazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
CFTR dele2, 3	DEL	c.54-5940_ 273+10250 del21kb	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
E60X	SNV	c.178G>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
P67L	SNV	c.200C>T	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R75X	SNV	c.223C>T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G85E	SNV	c.254G>A	500	6	2	0	492	0	0	100	100	100
394delTT	DIV	c.262_263 delTT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
406-1 G>A	SNV	c.274-1G>A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
E92X	SNV	c.274G>T	500	0	1	1	498	0	0	100	100	100
D110H	SNV	c.328G>C	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R117C	SNV	c.349C>T	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
R117H	SNV	c.350G>A	500	17	2	0	481	0	0	100	100	100
Y122X	SNV	c.366T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
621+1G>T	SNV	c.489+1G>T	500	7	5	0	488	0	0	100	100	100
663delT	DIV	c.531delT	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
G178R	SNV	c.532G>A	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
711+1G>T	SNV	c.579+1G>T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
P205S*	SNV	c.613C>T	500	1	0	1	498	0	0	100*	100	100
L206W	SNV	c.617T>G	500	8	1	0	491	0	0	100	100	100
1078delT	DIV	c.948delT	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
G330X	SNV	c.988G>T	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R334W	SNV	c.1000C>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
I336K	SNV	c.1007T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100

Variante (nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identifi- cazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identifi- cazioni negative (wild type)	N. di mancate identifi- cazioni	N. di identifi- cazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
1154insTC	DIV	c.1022_1023 insTC	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R347H	SNV	c.1040G>A	500	6	1	1	492	0	0	100	100	100
R347P	SNV	c.1040G>C	500	3	2	0	495	0	0	100	100	100
R352Q	SNV	c.1055G>A	500	5	0	0	495	0	0	100	100	100
A455E	SNV	c.1364C>A	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
S466X(C>G)	SNV	c.1397C>G	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
1548delG	DIV	c.1418delG	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
Q493X	SNV	c.1477C>T	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
I507del	DIV	c.1519_1521 delATC	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
F508del	DIV	c.1521_1523 delCTT	500	84	29	0	387	0	0	100	100	100
1677delTA	DIV	c.1545_1546 delTA	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
V520F	SNV	c.1558G>T	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
1717-1G>A	SNV	c.1585-1G>A	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
G542X	SNV	c.1624G>T	500	12	3	0	485	0	0	100	100	100
S549N	SNV	c.1646G>A	500	2	2	1	495	0	0	100	100	100
S549R (c.1647T>G)	SNV	c.1647T>G	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G551D	SNV	c.1652G>A	500	8	3	0	489	0	0	100	100	100
R553X	SNV	c.1657C>T	500	8	2	0	490	0	0	100	100	100
A559T	SNV	c.1675G>A	500	4	0	1	495	0	0	100	100	100
R560T	SNV	c.1679G>C	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
1812-1 G>A	SNV	c.1680-1G>A	500	0	2	0	498	0	0	100	100	100
1898+1G>A	SNV	c.1766+1G>A	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100

Variante (nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identifi- cazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identifi- cazioni negative (wild type)	N. di mancate identifi- cazioni	N. di identifi- cazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
2143delT	DIV	c.2012delT	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100
2183AA>G	DIV	c.2051_2052delAAinsG	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
2184insA	DIV	c.2052_2053insA	500	3	0	1	496	0	0	100	100	100
2184delA	DIV	c.2052delA	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R709X	SNV	c.2125C>T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
K710X	SNV	c.2128A>T	500	3	0	0	497	0	0	100	100	100
2307insA	DIV	c.2175_2176insA	500	3	0	2	495	0	0	100	100	100
R764X	SNV	c.2290C>T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
W846X	SNV	c.2537G>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
2789+5G>A	SNV	c.2657+5G>A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
Q890X	SNV	c.2668C>T	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3120G>A	SNV	c.2988G>A	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3120+1G>A	SNV	c.2988+1G>A	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100
3272-26A>G	SNV	c.3140-26A>G	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R1066C	SNV	c.3196C>T	500	6	0	0	494	0	0	100	100	100
R1066H	SNV	c.3197G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
W1089X	SNV	c.3266G>A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
Y1092X(C>A)	SNV	c.3276C>A	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
M1101K	SNV	c.3302T>A	500	2	2	0	496	0	0	100	100	100
R1158X	SNV	c.3472C>T	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100
R1162X	SNV	c.3484C>T	500	5	1	0	494	0	0	100	100	100
3659delC	DIV	c.3528delC	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100

Variante (nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identifi- cazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identifi- cazioni negative (wild type)	N. di mancate identifi- cazioni	N. di identifi- cazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
S1196X	SNV	c.3587C>G	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3791delC	DIV	c.3659delC	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
3849+10kbC>T	SNV	c.3717+12 191C>T	500	11	2	0	487	0	0	100	100	100
3876delA	DIV	c.3744delA	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
S1251N	SNV	c.3752G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
3905insT	DIV	c.3773_3 774insT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
W1282X	SNV	c.3846G>A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
N1303K	SNV	c.3909C>G	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
CFTR dele22,23 [§]	DEL	c.3964-78_ 4242+577del	500	1	0	1	498	1 [§]	0	100	99,80	99,80
M1V	SNV	c.1A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q39X	SNV	c.115C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
405+1 G>A	SNV	c.273+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E92K	SNV	c.274G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q98X	SNV	c.292C>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
457TAT>G	DIV	c.325_327 delTATinsG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
574delA	DIV	c.442delA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
711+3A>G	SNV	c.579+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
711+5 G>A	SNV	c.579+5G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
712-1 G>T	SNV	c.580-1G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
H199Y	SNV	c.595C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q220X	SNV	c.658C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variante (nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identifi- cazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identifi- cazioni negative (wild type)	N. di mancate identi- ficazioni	N. di identi- ficazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
852del22	DIV	c.720741 delAGGG AGAAT GATGAT GAAGTAC	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
T338I	SNV	c.1013C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S341P	SNV	c.1021T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1213delT	DIV	c.1081delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1248+1G>A	SNV	c.1116+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1259insA	DIV	c.1127_1 128insA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
W401X (c.1202G>A)	SNV	c.1202G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W401X (c.1203G>A)	SNV	c.1203G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1341+1G>A	SNV	c.1209+1G>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
1461ins4	DIV	c.1329_ 1330ins AGAT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1525-1G>A	SNV	c.1393-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S466X(C>A)	SNV	c.1397C>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L467P	SNV	c.1400T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S489X	SNV	1466C>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
S492F	SNV	c.1475C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q525X	SNV	c.1573C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1717-8G>A	SNV	c.1585-8G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S549R (c.1645A>C)	SNV	c.1645A>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variante (nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identifi- cazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identifi- cazioni negative (wild type)	N. di mancate identifi- cazioni	N. di identifi- cazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
Q552X	SNV	c.1654C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R560K	SNV	c.1679G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1811+1.6kb A>G	SNV	c.1679+1.6 kbA>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E585X	SNV	c.1753G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1898+3A>G	SNV	c.1766+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L732X	SNV	c.2195T>G	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2347delG	DIV	c.2215delG	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2585delT	DIV	c.2453delT	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E822X	SNV	c.2464G>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2622+1 G>A [¶]	SNV	c.2490+1G>T [¶]	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E831X	SNV	c.2491G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R851X	SNV	c.2551C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
2711delT	DIV	c.2583delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L927P	SNV	c.2780T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S945L	SNV	c.2834C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3007delG	DIV	c.2875delG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G970R	SNV	c.2908G>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3121-1G>A	SNV	c.2989-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1065P	SNV	c.3194T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1077P [^]	SNV	c.3230T>C	500	0	0	1	499	0 [^]	0	100	100	100
Y1092X(C>G)	SNV	c.3276C>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E1104X	SNV	c.3310G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W1204X (c.3611G>A)	SNV	c.3611G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variante (nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identificazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni negative (wild type)	N. di mancate identificazioni	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
W1204X (c.3612G>A)	SNV	c.3612G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G1244E	SNV	c.3731G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4005+1G>A	SNV	c.3873+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4016insT	DIV	c.3884_3885insT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q1313X	SNV	c.3937C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4209TG TT>AA	DIV	c.4077_4080delT GTTinsAA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4382delA	DIV	c.4251delA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
PolyTG/ PolyT [€]	PolyTGPolyT	c.1210-12T[5_9]	19	17	2	0	0	0	0	100	N/D	100
I506V [¥]	SNV	c.1516A>G	1	0	0	0	1	0	0	N/D	100	100
I507V [¥]	SNV	c.1519A>G	1	0	0	0	1	0	0	N/D	100	100
F508C [¥]	SNV	c.1523T>G	1	0	0	0	1	0	0	N/D	100	100
Totale			67,522		557		66,965	1	0	100	> 99,99	> 99,99

DIV è un acronimo per Deletion/Insertion Variant (Variante delezione/inserzione).

* Il report Sanger indicava la variante P205S come eterozigote per il campione clinico. Una revisione dei dati ottenuti dalla traccia Sanger indicava tuttavia che la variante era in effetti omozigote e riportata erroneamente. MiSeqDx ha riportato la variante come omozigote.

[§] Un eterozigote del campione sintetico per l'esone 8 è stato riportato come eterozigote per la variante CFTR dele22, 23. Ulteriori indagini hanno rilevato che questo risultato proveniva da una contaminazione di livello ridotto.

[^] È stato determinato che il campione eterozigote sintetico originale era stato preparato impropriamente. Quando è stato analizzato successivamente dopo essere stato preparato usando lo stesso plasmide è stato rilevato.

[€] Quando R117H è positivo, la variante PolyTG/PolyT viene ulteriormente riportata.

[¥] Nel caso di una variante F508del omozigote, tre ulteriori basi wild type (ad es., varianti I506V, I507V, F508C) che non sono state identificate nel campione sono state ulteriormente riportate.

[¶] Lo studio di convalida originale per il saggio comprendeva due campioni sintetici contenenti il cambiamento del nucleotide c.2490+1G>T per la variante 2622+1 G>A (i dati non sono inclusi in questa tabella). Successivamente è stato svolto un secondo studio di convalida con un campione sintetico contenente il cambiamento del nucleotide c.2490+1G>A per supportare l'attuale cambiamento del nucleotide (c.2490+1G>A) associato con la variante.

Tabella 15 Accuratezza del saggio Cystic Fibrosis 139-Variant per I506V, I507V e F508C.

Variante (nome comune)	Identificazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni negative (wild type)	N. di mancate identificazioni	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
		Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
I506V	500	7	0	0	493	0	0	100	100	100
I507V	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
F508C	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100

Tabella 16 Accuratezza del saggio Cystic Fibrosis 139-Variant per le varianti PolyTG/PolyT

Genotipo PolyTGPolyT	N. di campioni clinici	N. di campioni linee cellulari	N. di campioni sintetici	N. di mancate identificazioni	N. di identificazioni non riuscite*	% accuratezza
(TG)9(T)7/(TG)11(T)7	2	0	0	0	1	50
(TG)9(T)9/(TG)10(T)7	1	0	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)9	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	25	8	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	10	1	0	0	1	90,9
(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	7	6	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)7	13	0	0	0	1	92,3
(TG)11(T)5/(TG)11(T)7	6	0	0	1	0	83,3
(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	52	8	0	0	0	100

Genotipo PolyTGPolyT	N. di campioni clinici	N. di campioni linee cellulari	N. di campioni sintetici	N. di mancate identificazioni	N. di identificazioni non riuscite*	% accuratezza
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9^	2	1	0	3^	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
Totale**		448		4	3	98,44

* I campioni non sono stati analizzati nuovamente.

^ Uno dei risultati discordanti proveniva dallo studio di riproducibilità. Il risultato PolyTG/PolyT per il campione era concordante su tutti i 18 replicati, ma discordante con il sequenziamento bidirezionale Sanger.

** Il conteggio totale dei campioni per la variante PolyTG/PolyT è 448 perché tutti i campioni sintetici (n = 52) sono stati creati mescolando plasmidi linearizzati con uno o due campioni della linea cellulare, che facevano parte dello studio di riproducibilità. Poiché riportando la variante PolyTG/PolyT per questi campioni sintetici aggiuntivi la variante verrebbe riportata eccessivamente, i campioni sintetici sono stati esclusi da questa analisi.

Riproducibilità

La riproducibilità del saggio Cystic Fibrosis 139-Variant è stata determinata mediante uno studio condotto in cieco in tre centri di sperimentazione con due operatori per ciascun centro. Due pannelli ben caratterizzati di 46 campioni ciascuno sono stati testati da ciascun operatore in ciascun centro per un totale di 810 identificazioni per centro. I pannelli erano costituiti da una miscela di DNA genomico proveniente da linee cellulari linfoblastoidi con varianti note nel gene *CFTR*, oltre che da sangue deleucocitato con aggiunta di linee cellulari linfoblastoidi con varianti note nel gene *CFTR*. I campioni di sangue servivano per consentire l'incorporazione delle fasi di estrazione necessarie per preparare il gDNA utilizzato come input primario per il flusso di lavoro del saggio.

La percentuale dei campioni "pass", vale a dire il numero di campioni che hanno superato la metrica QC al primo tentativo, è stata del 99,9%.

La concordanza positiva a livello di genotipo per tutte le varianti era del 99,77%. La concordanza negativa per tutte le posizioni wild type era del 99,88% e la concordanza complessiva per tutte le posizioni riportate era del 99,88%. Tutti i risultati del test sono basati su test iniziali. Per lo studio di riproducibilità non sono stati ripetuti test.

Tabella 17 Riproducibilità del saggio Cystic Fibrosis 139-Variant

Pannello	N. Campione	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di mancate identificazioni	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4*	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1*	100	100	100
A	5^	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135^	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9**	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
A	10**	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92

Pannello	N. Campione	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di mancate identificazioni	N. di identificazioni non riuscite	Concor- danza positiva (%)	Concor- danza negativa (%)	Concor- danza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	< 13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C non presente	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Pannello	N. Campione	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di mancate identificazioni	N. di identificazioni non riuscite	Concor- danza positiva (%)	Concor- danza negativa (%)	Concor- danza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Pannello	N. Campione	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di mancate identificazioni	N. di identificazioni non riuscite	Concor- danza positiva (%)	Concor- danza negativa (%)	Concor- danza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
B	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	59	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Pannello	N. Campione	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di mancate identificazioni	N. di identificazioni non riuscite	Concor-danza positiva (%)	Concor-danza negativa (%)	Concor-danza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 ^S	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 ^S	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75 [^]	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 [^]	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 ^S	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 ^S	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/D	100	100

Pannello	N. Campione	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di mancate identificazioni	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Totale				74.556	2.209			221.182			4	273	99,77	99,88	99,88

* La posizione del wild type corrispondente alla variante N1303K per un replicato ha prodotto un'identificazione non riuscita a causa della copertura insufficiente.

^ Un replicato dei campioni 5 e 75 ha registrato una percentuale di identificazione dello 0%. Ulteriore investigazione indica che i campioni potrebbero non essere stati aggiunti alla piastra campioni prima della preparazione delle librerie perché i volumi dei campioni rimanenti nelle provette erano coerenti con nessun volume rimosso.

** Evidenze empiriche indicano che probabilmente i campioni 9 e 10 sono stati scambiati dall'operatore prima della preparazione delle librerie.

§ La posizione del wild type corrispondente alla variante M1V per un replicato di ciascuno dei due campioni ha prodotto un'identificazione non riuscita a causa della copertura insufficiente.

Tabella 18 Informazioni aggiuntive sulle varianti dello studio di riproducibilità

Variazione (nome comune)	Tipo di variante	Regione del gene CFTR
PolyTG/PolyT	DIV* composto	Introne 9
2183AA>G	DIV* composto	Esone 14
CFTR dele2, 3	DEL	Introne1-Introne3
1154insTC	DIV*	Esone 8
I507del	DIV*	Esone 11
F508del	DIV*	Esone 11
2143delT	DIV*	Esone 14
3659delC	DIV*	Esone 22
3876delA	DIV*	Esone 23
394delTT	DIV in regione omopolimerica*	Esone 3
1078delT	DIV in regione omopolimerica*	Esone 8
2184delA	DIV in regione omopolimerica*	Esone 14
3905insT	DIV in regione omopolimerica*	Esone 23
E60X	SNV	Esone 3
R75X	SNV	Esone 3
G85E	SNV	Esone 3
E92X	SNV	Esone 4
R117H	SNV	Esone 4
Y122X	SNV	Esone 4
621+1G>T	SNV	Introne 4
G178R	SNV	Esone 5
711+1G>T	SNV	Introne 5
L206W	SNV	Esone 6
G330X	SNV	Esone 8
R334W	SNV	Esone 8
I336K	SNV	Esone 8
R347P	SNV	Esone 8
R347H	SNV	Esone 8
A455E	SNV	Esone 10
Q493X	SNV	Esone 11
1717-1G>A	SNV	Introne 11
G542X	SNV	Esone 12
S549N	SNV	Esone 12
S549R (c.1647T>G)	SNV	Esone 12
G551D	SNV	Esone 12
R553X	SNV	Esone 12
R560T	SNV	Esone 12
1812-1 G>A	SNV	Introne 12

Variazione (nome comune)	Tipo di variante	Regione del gene CFTR
1898+1G>A	SNV	Introne 13
W846X	SNV	Esone 15
2789+5G>A	SNV	Introne 16
3120+1G>A	SNV	Introne 18
3272-26A>G	SNV	Introne 19
Y1092X(C>A)	SNV	Esone 20
M1101K	SNV	Esone 20
R1158X	SNV	Esone 22
R1162X	SNV	Esone 22
3849+10kbC>T	SNV	Introne 22
W1282X	SNV	Esone 23
N1303K	SNV	Esone 24

* DIV è un acronimo per Deletion/Insertion Variant (variante delezione/inserzione).

Estrazione del DNA

Tre diversi metodi di estrazione usati comunemente e disponibili in commercio, ossia estrazione mediante microsferi magnetiche, precipitazione alcolica e isolamento mediante colonna di gel di silice, sono stati valutati utilizzando sangue intero anticoagulato in EDTA. Nello studio sono stati utilizzati complessivamente 14 campioni di sangue univoci che rappresentavano i wild type e i tre genotipi mutanti (tre campioni con F508del, un campione con I506V e un campione con D110H). I tre metodi di estrazione del DNA sono stati analizzati indipendentemente da due diversi operatori e ciascuno di loro ha eseguito tre corse per ciascun metodo di estrazione. Ciascuna estrazione è stata eseguita da ciascun operatore in giorni diversi. La concentrazione di DNA e il rapporto A260/A280 dei campioni di gDNA estratto sono stati determinati usando la spettrofotometria. La dimensione complessiva dei campioni per ciascun metodo di estrazione esaminato nello studio è stato pari a 168 (14 campioni x 2 operatori/metodo di estrazione x 3 corse/operatore x 2 replicati/campioni di gDNA estratto).

Metodo di estrazione	Numero di campioni analizzati	Percentuale di identificazione	Accuratezza	Percentuale di campioni "first pass" (primo passaggio)*
Precipitazione alcolica	168	100%	100%	100%
Isolamento su colonna di gel di silice	168	100%	100%	100%
Estrazione con microsferi magnetiche	168	100%	100%	100%

* La percentuale di campioni che presentano una percentuale di identificazione di $\geq 99\%$ nella prima corsa.

Input di DNA

L'intervallo di input di DNA per il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant è stato valutato eseguendo uno studio di diluizione in serie usando 14 campioni di DNA rappresentativi che contenevano di 16 varianti univoche del gene della fibrosi cistica. Ciascun campione è stato analizzato in duplicati a nove livelli di input di DNA che andavano da 1250 ng a 1 ng (1.250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng e 1 ng). Per determinare l'accuratezza, i genotipi dei campioni sono stati confrontati con i dati del sequenziamento bidirezionale Sanger e

le delezioni sono state confrontate con il saggio PCR. 1.250 ng e 25 ng sono stati identificati, rispettivamente, come il limite superiore e inferiore per l'input di DNA in quanto presentavano una percentuale di 'first pass' del campione di ≥ 95 (100% di accuratezza e percentuale di identificazione).

Gli input di DNA di 1.250 ng, 250 ng e 100 ng sono stati ulteriormente analizzati con quattro campioni di DNA rappresentativi ed almeno 20 replicati per ciascun livello di input di DNA per ciascun campione ($n=4 \times 20=80$ campioni), mentre il legame inferiore di 25 ng è stato analizzato con 14 campioni, 20 replicati per ciascun campione ($n=14 \times 20=280$ campioni). L'accuratezza e la percentuale di "first pass" dei campioni sono risultati pari al 100% a tutti i livelli di input di DNA.

I risultati indicano che, per produrre risultati accurati, il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant può essere usato nell'intervallo di input di DNA di 1.250-25 ng.

Sostanze interferenti

Per valutare l'impatto delle sostanze interferenti sul saggio Cystic Fibrosis 139-Variant, sono state valutate le prestazioni del saggio in presenza e in assenza di potenziali sostanze interferenti. Nello studio sono stati testati otto campioni di sangue intero inclusi tre campioni positivi alla fibrosi cistica con genotipi univoci. Quattro sostanze interferenti endogene (bilirubina, colesterolo, emoglobina e trigliceride) sono state testate aggiungendole ai campioni di sangue prima dell'estrazione del DNA. I limiti di concentrazione per ciascuna sostanza sono riportati nella tabella seguente. Inoltre, per valutare l'interferenza risultante dalla raccolta del sangue (prelievo breve) EDTA è stato aggiunto ai campioni di sangue e, per valutare l'interferenza risultante dalla preparazione dei campioni, è stato aggiunto al DNA genomico purificato un tampone di lavaggio finale, ottenuto mediante un metodo di isolamento su colonna di gel di silice.

Il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant ha raggiunto una percentuale di identificazione del 100% per tutti i campioni analizzati e una riproducibilità del 100% nell'identificazione dei genotipi tra i campioni in presenza e in assenza delle sostanze interferenti.

Per valutare l'impatto dell'interferenza degli index primer in multiplex, è stato eseguito uno studio di contaminazione incrociata usando due campioni, ciascun campione con genotipi omozigoti univoci a quattro diverse posizioni genomiche e due rispettivi index primer. Non è stato osservato alcun cambiamento nell'identificazione delle varianti con livelli di contaminazione inferiore al 40%. Il genotipo del campione è diventato eterozigote quando i livelli di contaminazione erano $\geq 40\%$.

Non è stata osservata alcuna interferenza da parte di qualsiasi interferente endogeno o esogeno.

Sostanza del test	Numero totale di replicati	Concentrazione testata nel sangue (limite superiore)	Concentrazione testata nel sangue (limite inferiore)	Percentuale di identificazione
Bilirubina	16	684 $\mu\text{mol/l}$	137 $\mu\text{mol/l}$	100%
Colesterolo	16	13 mmol/l	2,6 mmol/l	100%
Emoglobina	16	2 g/l	0,4 g/l	100%
Trigliceride	16	37 mmol/l	7,4 mmol/l	100%
EDTA	16	7,0 mg/ml	2,8 mg/ml	100%

Indicizzazione dei campioni

Gli index primer dei campioni sono utilizzati nel saggio per assegnare un codice a barre univoco a ciascun campione di DNA, consentendo di raggruppare in un pool più campioni in una singola corsa di sequenziamento. Sono stati testati complessivamente 96 indici di campioni mediante otto campioni di DNA univoci al fine di verificare la capacità del saggio di identificare i genotipi in modo coerente per un dato campione fra diverse combinazioni di primer di indicizzazione. Ciascun campione è stato analizzato con 12 diverse combinazioni di primer di indicizzazione. I risultati ottenuti dai campioni sono stati confrontati con i dati del sequenziamento bidirezionale Sanger per tutte le posizioni/varianti eccetto due ampie delezioni, confermate mediante un saggio di PCR in duplex. Riproducibilità e accuratezza sono risultate del 100% per tutte le combinazioni di index primer/campione.

Equivalenza delle prestazioni con il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina

Il saggio TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant (TruSight CF139) utilizza lo stesso flusso di lavoro per la preparazione delle librerie e gli stessi reagenti del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis (MiSeqDx CF139) Illumina. TruSight CF139 utilizza MiSeqDx Reagent Kit v3 mentre MiSeqDx CF139 utilizza i reagenti di sequenziamento inclusi con il saggio. Per dimostrare l'equivalenza tra TruSight CF139 e MiSeqDx CF139, i risultati ottenuti da otto corse TruSight CF139 sono stati confrontati con una singola corsa MiSeqDx CF139 come 'gold standard'. Le corse TruSight CF139 sono state eseguite a una processività di 96 campioni (la processività massima di campioni per TruSight CF139) e le corse MiSeqDx CF139 a una processività di 48 campioni (processività massima di campioni per MiSeqDx CF139). Le fonti di variabilità inclusi nelle corse TruSight CF139 includevano tre eventi di preparazione delle librerie (ciascuno con un lotto TruSight Cystic Fibrosis univoco), tre operatori, tre strumenti MiSeqDx e tre lotti di MiSeqDx Reagent Kit v3.

Le identificazioni delle varianti ottenute dalle corse TruSight CF139 sono state confrontate con le identificazioni ottenute dalla corsa MiSeqDx CF139. In ogni corsa TruSight CF139 sono stati inclusi 47 campioni univoci con 2-3 replicati per campione (95 campioni di DNA e 1 NTC per corsa). Per la corsa MiSeqDx CF139 sono stati sequenziati gli stessi 47 campioni come singoli (47 campioni di DNA + 1 NTC per corsa). Lo stesso pannello di campioni includeva campioni di DNA Coriell estratti da linee cellulari immortalizzate e includeva campioni rappresentanti tutti gli alleli delle 23 mutazioni ACMG, le varianti delezione-inserzione (incluse le inserzioni/delezioni in regioni omopolimeriche e inserzioni con delezione nella stessa regione), varianti omozigote, varianti omozigote composte, una delle ampie delezioni target, una variante PolyTG/PolyT comune, numerose varianti di singolo nucleotide e un campione con nessuna variante rilevata. La [Tabella 19](#) fornisce un riepilogo dei risultati per genotipo. La [Tabella 20](#) mostra la concordanza tra i saggi per tipo di variante. La concordanza complessiva (totale) tra i saggi era > 99,99%.

Tabella 19 Prestazioni dell'identificazioni delle varianti del saggio TruSight CF 139-Variant confrontato con il saggio MiSeqDx CF 139-Variant

		Saggio MiSeqDx CF 139-Variant				Totale
		Variante HOM	Variante HET	Wild type	Nessuna identificazione	
Saggio TruSight CF 139-Variant	Variante HOM	87	-	-	-	87
	Variante HET	-	1.098	-	-	1.098
	Wild type	-	-	113.889	-	113.889
	Nessuna identificazione	-	-	-	-	-
	Totale	87	1.098	113.889	-	115.074

Tabella 20 Prestazioni per tipo di variante del saggio TruSight CF 139-Variant confrontato con il saggio MiSeqDx CF 139-Variant

Tipo di variante	Identificazioni corrette	Identificazioni errate	Nessuna identificazione	Concordanza con il saggio MiSeqDx CF 139
SNV	672	0	0	100,00% (672/672)
DEL	18	0	0	100,00% (18/18)
DIV	495	0	0	100,00% (495/495)
PolyTG/PolyT	17	1	0	94,44% (17/18)
Nessuna (wild type)	113.889	0	0	100,00% (113.889/113.889)
Totale	115.091	1	0	> 99,99% (115.091/115.092)

È stata osservata una sola identificazione discordante tra TruSight CF139 e MiSeqDx CF139. Questa identificazione errata era una variante PolyTG/PolyT. La [Tabella 21](#) mostra un riepilogo sulla concordanza PolyTG/PolyT. Poiché il genotipo PolyTG/PolyT viene riportato solo se viene rilevata anche la variante R117H, il set di dati include solo le identificazioni PolyTG/PolyT da una singola fonte di DNA.

Tabella 21 Prestazioni dell'identificazioni delle varianti PolyTG/PolyT del saggio TruSight CF 139-Variant confrontato con il saggio MiSeqDx CF 139-Variant

		Saggio MiSeqDx CF 139-Variant			Totale
		(TG)12 (T)5 / (TG)10 (T)9	(TG)12 (T)5 / (TG)12 (T)5	Nessuna identificazione	
Saggio TruSight CF 139-Variant	(TG)12(T)5 / (TG)10(T)9	17	-	-	17
	(TG)12(T)5 / (TG)12(T)5	1	-	-	1
	Nessuna identificazione	-	-	-	-
	Totale	18	-	-	18

Caratteristiche delle prestazioni per il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Le caratteristiche delle prestazioni del saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing sono basati su studi che utilizzano il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant. L'equivalenza tra i saggi TruSight e MiSeqDx sono forniti in [Equivalenza delle prestazioni con il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina a pagina 89](#).

Accuratezza

L'accuratezza del saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing è stata determinata valutando 500 campioni che rappresentano un'ampia varietà di varianti CFTR provenienti da quattro fonti diverse. La fonte principale dei dati di accuratezza è stato uno studio di accuratezza clinica condotto usando un pannello di 366 campioni. La maggior parte (n= 355) dei campioni consistevano di campioni clinici di gDNA archiviati e resi anonimi isolati da sangue umano. I restanti 11 campioni sono stati ottenuti da campioni di linee cellulari disponibili in commercio.

I dati di questo studio sono stati integrati con i dati di accuratezza ottenuti da 68 campioni di linee cellulari nello studio di riproducibilità, 14 campioni clinici ottenuti dallo studio di valutazione analitica del metodo di estrazione e 52 campioni di plasmidi sintetici. I plasmidi sintetici sono stati progettati per includere il contesto genomico di varianti rare e contenuti ovunque da una a dieci varianti entro lo stesso costrutto. Sono stati linearizzati, diluiti a numero di copie equivalenti di DNA genomico e miscelati con campioni di DNA genomico umano di genotipo wild type a numero di copie equivalenti per imitare un campione eterozigote.

Per il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, un totale di 5.206 posizioni sono state confrontate con i metodi di riferimento del sequenziamento bidirezionale Sanger e l'analisi mediante PCR. I risultati di genotipizzazione per i siti SNV e Indel piccole, inclusa la regione PolyTG/PolyT, sono stati confrontati con l'analisi bidirezionale delle sequenze di Sanger.

Sono stati usati due saggi convalidati basati sulla PCR come metodo di riferimento per due ampie delezioni nel pannello. Ciascun saggio PCR in duplex ha utilizzato due gruppi di primer per discriminare tra genotipi wild type, eterozigote e omozigote. Uno dei gruppi di primer è stato progettato per fiancheggiare i breakpoint delle delezioni, mentre l'altro gruppo ha amplificato una regione interna alla delezione. I due prodotti sono stati rilevati mediante separazione in base alla dimensione su un gel di agarosio. I saggi PCR sono stati convalidati usando un pannello di 28 campioni in tutto (22 campioni per ciascuna delezione) che consiste di campioni di DNA genomico di linee cellulari e derivati dal sangue e plasmidi sintetici, che hanno incluso i genotipi WT,

HET e HOM per ciascuna ampia delezione. È stato confermato che i saggi PCR presentano una specificità e una riproducibilità del 100% per tutti i campioni testati, mediante la valutazione dei prodotti della PCR su un gel di agarosio. L'accuratezza dei saggi PCR è stata confermata usando il sequenziamento Sanger ed è stata del 100% per tutti i campioni.

L'accuratezza è stata determinata per ogni genotipo attraverso tre misurazioni statistiche. La concordanza positiva (PA) è stata calcolata per ciascun genotipo di variante dividendo il numero di campioni con identificazioni di varianti concordanti per il numero totale di campioni con detta variante come identificato dai metodi di riferimento. La concordanza negativa (NA) è stata calcolata su tutte le posizioni wild type (WT) dividendo il numero di posizioni WT concordanti per il numero totale di posizioni WT come definito dai metodi di riferimento. La concordanza complessiva (OA) è stata calcolata su tutte le posizioni riportate dividendo il numero di posizioni di WT e delle varianti concordanti per il numero totale di posizioni riportate determinato in base ai metodi di riferimento.

Il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing presentava una concordanza positiva (PA) a livello di genotipo del 99,66%, comprese le varianti PolyTG/PolyT (100% escludendo le varianti PolyTG/PolyT). La concordanza negativa (NA) per tutte le posizioni WT era > 99,99% e la concordanza complessiva (OA) per tutte le posizioni riportate era > 99,99%.

Tabella 22 Accuratezza complessiva del saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Mancate identificazioni	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
117120141	c.-8G>C^	SNV	Esone1	25	3	0	0	0	100
117120145	c.-4G>C^	SNV	Esone1	3	2	0	0	0	100
M1V	c.1A>G	SNV	Esone1	0	0	1	0	0	100
CFTR dele2, 3	c.54-5940_273+10250 del21kb	DEL	Introne1	4	1	0	0	0	100
R31C	c.91C>T	SNV	Esone 2	3	1	0	0	0	100
Q39X	c.115C>T	SNV	Esone 2	0	0	1	0	0	100
E60X	c.178G>T	SNV	Esone3	6	1	0	0	0	100
P67L	c.200C>T	SNV	Esone3	1	0	1	0	0	100
R74W	c.220C>T	SNV	Esone3	0	2	0	0	0	100
R74Q	c.221G>A	SNV	Esone3	2	0	0	0	0	100
R75X	c.223C>T	SNV	Esone3	3	1	0	0	0	100
R75Q	c.224G>A	SNV	Esone3	20	1	0	0	0	100
G85E	c.254G>A	SNV	Esone3	6	2	0	0	0	100
394delTT	c.262_263 delTT	DIV	Esone3	3	1	0	0	0	100
405+1G>A	c.273+1G>A	SNV	Introne3	0	0	1	0	0	100
406-1 G>A	c.274-1G>A	SNV	Esone4	4	0	0	0	0	100
E92K	c.274G>A	SNV	Esone4	0	0	1	0	0	100
E92X	c.274G>T	SNV	Esone4	0	1	1	0	0	100
Q98X	c.292C>T	SNV	Esone4	0	0	2	0	0	100
444delA	c.312delA	DIV	Esone4	0	2	0	0	0	100
457TAT>G	c.325_327 delTAT insG	DIV	Esone4	0	0	1	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Mancate identificazioni	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
D110H	c.328G>C	SNV	Esone4	1	0	1	0	0	100
R117C	c.349C>T	SNV	Esone4	4	0	0	0	0	100
R117H	c.350G>A	SNV	Esone4	17	2	0	0	0	100
Y122X	c.366T>A	SNV	Esone4	0	1	0	0	0	100
F143LfsX10	c.425delT	DIV	Esone4	0	1	0	0	0	100
574delA	c.442delA	DIV	Esone4	0	0	2	0	0	100
Q151K	c.451C>A	SNV	Esone4	1	0	0	0	0	100
621+1G>T	c.489+1G>T	SNV	Introne4	7	5	0	0	0	100
621+3A>G	c.489+3A>G	SNV	Introne4	1	0	0	0	0	100
663delT	c.531delT	DIV	Esone5	1	0	1	0	0	100
G178R	c.532G>A	SNV	Esone5	1	1	0	0	0	100
711+1G>T	c.579+1G>T	SNV	Introne5	3	1	0	0	0	100
711+3A>G	c.579+3A>G	SNV	Introne5	0	0	1	0	0	100
711+5G>A	c.579+5G>A	SNV	Introne5	0	0	1	0	0	100
712-1G>T	c.580-1G>T	SNV	Esone6	0	0	1	0	0	100
H199Y	c.595C>T	SNV	Esone6	0	0	1	0	0	100
P205S	c.613C>T	SNV	Esone6	1	0	1	0	0**	100
L206W	c.617T>G	SNV	Esone6	8	1	0	0	0	100
A209S	c.625G>T	SNV	Esone6	0	1	0	0	0	100
Q220X	c.658C>T	SNV	Esone6	0	0	1	0	0	100
L227R	c.680T>G	SNV	Esone6	0	0	1	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Mancate identificazioni	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
852del22	c.720_741 delAGGG AGAATG ATGATG AAGTAC	DIV	Esone6	0	0	1	0	0	100
E279D	c.837A>T	SNV	Esone7	1	0	0	0	0	100
R297Q	c.890G>A	SNV	Esone8	2	0	0	0	0	100
1078delT	c.948delT	DIV	Esone8	1	1	0	0	0	100
L320V	c.958T>G	SNV	Esone8	1	0	0	0	0	100
G330X	c.988G>T	SNV	Esone8	1	1	0	0	0	100
R334W	c.1000C>T	SNV	Esone8	6	1	0	0	0	100
I336K	c.1007T>A	SNV	Esone8	0	1	0	0	0	100
T338I	c.1013C>T	SNV	Esone8	0	0	1	0	0	100
1154insTC	c.1022_1023insTC	DIV	Esone8	0	1	0	0	0	100
S341P	c.1021T>C	SNV	Esone8	0	0	1	0	0	100
R347H	c.1040G>A	SNV	Esone8	6	1	1	0	0	100
R347P	c.1040G>C	SNV	Esone8	3	2	0	0	0	100
R352Q	c.1055G>A	SNV	Esone8	5	0	0	0	0	100
Q359K/ T360K	c.[1075C>A ;1079C>A]	SNV	Esone8	0	0	1	0	0	100
1213delT	c.1081delT	DIV	Esone8	0	0	1	0	0	100
1248+1G>A	c.1116+1G>A	SNV	Introne8	0	0	1	0	0	100
1259insA	c.1127_1128insA	DIV	Esone9	0	0	2	0	0	100
W401X (c.1202G>A)	c.1202G>A	SNV	Esone9	0	0	1	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Mancate identificazioni	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
W401X (c.1203G>A)	c.1203G>A	SNV	Esone9	0	0	1	0	0	100
1341+1G>A	c.1209+1G>A	SNV	Introne9	0	0	2	0	0	100
PolyTGPolyT	N/D	PolyTG PolyT	Introne9	369	79	52	3	4 [#]	98,60
1461ins4	c.1329_1330ins AGAT	DIV	Esone10	0	0	1	0	0	100
A455E	c.1364C>A	SNV	Esone10	4	2	0	0	0	100
1525-1G>A	c.1393-1G>A	SNV	Esone11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>A)	c.1397C>A	SNV	Esone11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>G)	c.1397C>G	SNV	Esone11	1	0	1	0	0	100
L467P	c.1400T>C	SNV	Esone11	0	0	1	0	0	100
V470M	c.1408G>A	SNV	Esone11	311	71	0	0	0	100
1548delG	c.1418delG	DIV	Esone11	1	0	1	0	0	100
P477S	c.1429C>T	SNV	Esone11	0	1	0	0	0	100
S485T	c.1454G>C	SNV	Esone11	1	0	0	0	0	100
S489X	c.1466C>A	SNV	Esone11	0	0	2	0	0	100
S492F	c.1475C>T	SNV	Esone11	0	0	1	0	0	100
Q493X	c.1477C>T	SNV	Esone11	4	2	0	0	0	100
I506V	c.1516A>G	SNV	Esone11	7	0	0	0	0	100
I507del	c.1519_1521 delATC	DIV	Esone11	4	2	0	0	0	100
F508del	c.1521_1523 delCTT	DIV	Esone11	84	29	0	0	0	100
I507V	c.1519A>G	SNV	Esone11	0	1	0	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Mancate identificazioni	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
F508C	c.1523T>G	SNV	Esone11	1	1	0	0	0	100
1677delTA	c.1545_1546 delTA	DIV	Esone11	1	0	0	0	0	100
V520F	c.1558G>T	SNV	Esone11	2	0	0	0	0	100
Q525X	c.1573C>T	SNV	Esone11	0	0	1	0	0	100
E527E	c.1581A>G	SNV	Esone11	3	2	0	0	0	100
E528E	c.1584G>A	SNV	Esone11	6	2	0	0	0	100
1717-8G>A	c.1585-8G>A	SNV	Introne11	0	0	1	0	0	100
1717-1G>A	c.1585-1G>A	SNV	Esone12	4	1	0	0	0	100
G542X	c.1624G>T	SNV	Esone12	12	3	0	0	0	100
S549R (c.1645A>C)	c.1645A>C	SNV	Esone12	0	0	1	0	0	100
S549N	c.1646G>A	SNV	Esone12	2	2	1	0	0	100
S549R (c.1647T>G)	c.1647T>G	SNV	Esone12	3	1	0	0	0	100
G551D	c.1652G>A	SNV	Esone12	8	3	0	0	0	100
Q552X	c.1654C>T	SNV	Esone12	0	0	1	0	0	100
R553X	c.1657C>T	SNV	Esone12	8	2	0	0	0	100
I556V	c.1666A>G	SNV	Esone12	1	0	0	0	0	100
L558S	c.1673T>C	SNV	Esone12	0	0	1	0	0	100
A559T	c.1675G>A	SNV	Esone12	4	0	1	0	0	100
R560K	c.1679G>A	SNV	Esone12	0	0	1	0	0	100
R560T	c.1679G>C	SNV	Esone12	6	1	0	0	0	100
1811+1.6kb A>G	c.1679+1.6 kbA>G	SNV	Introne12	0	0	1	0	0	100
1812-1 G>A	c.1680-1G>A	SNV	Esone13	0	2	0	0	0	100
A561T	c.1681G>A	SNV	Esone13	1	0	0	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Mancate identificazioni	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
V562I	c.1684G>A	SNV	Esone13	1	0	0	0	0	100
Y569D	c.1705T>G	SNV	Esone13	0	0	1	0	0	100
P574H	c.1721C>A	SNV	Esone13	0	1	0	0	0	100
G576A	c.1727G>C	SNV	Esone13	4	1	0	0	0	100
D579G	c.1736A>G	SNV	Esone13	0	0	1	0	0	100
E585X	c.1753G>T	SNV	Esone13	0	0	1	0	0	100
1898+1G>A	c.1766+1G>A	SNV	Introne13	2	1	0	0	0	100
1898+3A>G	c.1766+3A>G	SNV	Introne13	0	0	1	0	0	100
H609R	c.1826A>G	SNV	Esone14	0	1	0	0	0	100
D614G	c.1841A>G	SNV	Esone14	0	0	2	0	0	100
R668C	c.2002C>T	SNV	Esone14	5	2	0	0	0	100
R668H	c.2003G>A	SNV	Esone14	1	0	0	0	0	100
2143delT	c.2012delT	DIV	Esone14	2	1	0	0	0	100
K684TfsX4	c.2046_2047 delAA	DIV	Esone14	0	0	1	0	0	100
2183AA>G	c.2051_2052 delAAinsG	DIV	Esone14	3	1	0	0	0	100
2184delA	c.2052delA	DIV	Esone14	1	1	0	0	0	100
2184insA	c.2052_2053 insA	DIV	Esone14	3	0	1	0	0	100
S686Y	c.2057C>A	SNV	Esone14	0	1	0	0	0	100
R709X	c.2125C>T	SNV	Esone14	1	0	2	0	0	100
K710X	c.2128A>T	SNV	Esone14	3	0	0	0	0	100
E725K	c.2173G>A	SNV	Esone14	2	0	0	0	0	100
2307insA	c.2175_2176 insA	DIV	Esone14	3	0	2	0	0	100
L732X	c.2195T>G	SNV	Esone14	0	0	2	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Mancate identificazioni	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
2347delG	c.2215delG	DIV	Esone14	0	0	2	0	0	100
P750L	c.2249C>T	SNV	Esone14	1	0	0	0	0	100
V754M	c.2260G>A	SNV	Esone14	2	1	0	0	0	100
R764X	c.2290C>T	SNV	Esone14	1	0	2	0	0	100
2585delT	c.2453delT	DIV	Esone14	0	0	2	0	0	100
E822X	c.2464G>T	SNV	Esone14	0	0	2	0	0	100
2622+1G>A	c.2490+1G>T	SNV	Introne14	0	0	2	0	0	100
E831X	c.2491G>T	SNV	Esone15	0	0	1	0	0	100
D836Y	c.2506G>T	SNV	Esone15	0	1	0	0	0	100
W846X	c.2537G>A	SNV	Esone15	0	1	0	0	0	100
R851X	c.2551C>T	SNV	Esone15	0	0	1	0	0	100
T854T	c.2562T>G	SNV	Esone15	212	44	0	0	0	100
2711delT	c.2583delT	DIV	Esone15	0	0	1	0	0	100
V868V	c.2604A>G	SNV	Esone15	2	0	0	0	0	100
c.2657+2_2657+3insA	c.2657+2_2657+3insA	DIV	Introne16	0	0	1	0	0	100
2789+5G>A	c.2657+5G>A	SNV	Introne16	9	1	0	0	0	100
Q890X	c.2668C>T	SNV	Esone17	1	0	0	0	0	100
A923A	c.2769C>T	SNV	Esone17	1	0	0	0	0	100
L927P	c.2780T>C	SNV	Esone17	0	0	1	0	0	100
S945L	c.2834C>T	SNV	Esone17	0	0	1	0	0	100
M952T	c.2855T>C	SNV	Esone17	1	0	0	0	0	100
3007delG	c.2875delG	DIV	Esone17	0	0	1	0	0	100
T966T	c.2898G>A	SNV	Esone17	5	0	0	0	0	100
G970R	c.2908G>C	SNV	Esone17	0	0	1	0	0	100
S977F	c.2930C>T	SNV	Esone18	0	0	1	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Mancate identificazioni	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
3120G>A	c.2988G>A	SNV	Esone18	1	0	0	0	0	100
3120+1G>A	c.2988+1G>A	SNV	Introne18	7	1	0	0	0	100
3121-1G>A	c.2989-1G>A	SNV	Esone19	0	0	1	0	0	100
L997F	c.2991G>C	SNV	Esone19	2	1	0	0	0	100
I1027T	c.3080T>C	SNV	Esone19	1	2	0	0	0	100
3272-26A>G	c.3140-26A>G	SNV	Introne19	0	1	0	0	0	100
F1052V	c.3154T>G	SNV	Esone20	0	1	0	0	0	100
L1065P	c.3194T>C	SNV	Esone20	0	0	1	0	0	100
R1066C	c.3196C>T	SNV	Esone20	6	0	0	0	0	100
R1066H	c.3197G>A	SNV	Esone20	1	0	1	0	0	100
G1069R	c.3205G>A	SNV	Esone20	0	1	0	0	0	100
R1070W	c.3208C>T	SNV	Esone20	0	2	0	0	0	100
R1070Q	c.3209G>A	SNV	Esone20	0	1	0	0	0	100
L1077P	c.3230T>C	SNV	Esone20	0	0	1	0	0 ^Y	100
W1089X	c.3266G>A	SNV	Esone20	4	0	0	0	0	100
Y1092X (C>A)	c.3276C>A	SNV	Esone20	3	1	0	0	0	100
Y1092X (C>G)	c.3276C>G	SNV	Esone20	0	0	1	0	0	100
T1095T	c.3285A>T	SNV	Esone20	7	0	0	0	0	100
M1101K	c.3302T>A	SNV	Esone20	2	2	0	0	0	100
E1104X	c.3310G>T	SNV	Esone20	0	0	1	0	0	100
c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	SNV	Introne20	0	1	0	0	0	100
D1152H	c.3454G>C	SNV	Esone21	10	1	0	0	0	100
V1153E	c.3458T>A	SNV	Esone21	1	0	0	0	0	100
R1158X	c.3472C>T	SNV	Esone22	7	1	0	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Mancate identificazioni	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
R1162X	c.3484C>T	SNV	Esone22	5	1	0	0	0	100
R1162L	c.3485G>T	SNV	Esone22	0	2	0	0	0	100
3659delC	c.3528delC	DIV	Esone22	4	1	0	0	0	100
S1196X	c.3587C>G	SNV	Esone22	1	0	0	0	0	100
W1204X (c.3611G>A)	c.3611G>A	SNV	Esone22	0	0	1	0	0	100
W1204X (c.3612G>A)	c.3612G>A	SNV	Esone22	0	0	1	0	0	100
3791delC	c.3659delC	DIV	Esone22	2	0	0	0	0	100
I1234V	c.3700A>G	SNV	Esone22	1	0	1	0	0	100
S1235R	c.3705T>G	SNV	Esone22	9	1	0	0	0	100
3849+10 kbC>T	c.3717+ 12191C>T	SNV	Introne22	11	2	0	0	0	100
G1244E	c.3731G>A	SNV	Esone23	0	0	1	0	0	100
3876delA	c.3744delA	DIV	Esone23	6	1	0	0	0	100
S1251N	c.3752G>A	SNV	Esone23	1	0	1	0	0	100
3905insT	c.3773_3774 insT	DIV	Esone23	3	1	0	0	0	100
D1270N	c.3808G>A	SNV	Esone23	0	2	0	0	0	100
W1282X	c.3846G>A	SNV	Esone23	9	1	0	0	0	100
P1290P	c.3870A>G	SNV	Esone23	10	3	0	0	0	100
4005+1G>A	c.3873+1G>A	SNV	Introne23	0	0	1	0	0	100
4016insT	c.3884_3885 insT	DIV	Esone24	0	0	1	0	0	100
T1299T	c.3897A>G	SNV	Esone24	3	0	0	0	0	100
N1303K	c.3909C>G	SNV	Esone24	9	1	0	0	0	100
Q1313X	c.3937C>T	SNV	Esone24	0	0	1	0	0	100
G1349D	c.4046G>A	SNV	Esone25	0	1	0	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Mancate identificazioni	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
4209TG TT>AA	c.4077_4080 delTGTT insAA	DIV	Esone25	0	0	1	0	0	100
CFTR dele22,23	c.3964-78_4242+577del	DEL	Introne24	1	0	1	0	0	100
4382delA	c.4251delA	DIV	Esone27	0	0	1	0	0	100
Y1424Y	c.4272C>T	SNV	Esone27	6	2	0	0	0	100
Q1463Q	c.4389G>A	SNV	Esone27	150	32	0	0	0	100
Totale di tutte le varianti (PA)†						2.072	3	4	99,66
Totale di tutti i WT (NA)						2600928	1	2 [§]	> 99,99
Totale di tutti i WT e varianti (OA)						2603000	4	6	> 99,99

DIV è un acronimo per Deletion/Insertion Variant (Variante delezione/inserzione).

* I campioni non sono stati analizzati nuovamente.

^ Il software non riporta il nome cDNA per questa coordinata genomica.

** Il report Sanger elencava la variante P205S come eterozigote per il campione clinico. Una revisione dei dati ottenuti dalla traccia Sanger indicava tuttavia che la variante era in effetti omozigote e riportata erroneamente. MiSeqDx ha riportato la variante come omozigote.

Uno dei risultati discordanti proveniva dallo studio di riproducibilità. Il risultato PolyTG/PolyT per il campione era concordante su tutti i 18 replicati, ma discordante con il sequenziamento bidirezionale Sanger.

¥ È stato determinato che il campione eterozigote sintetico originale era stato preparato impropriamente. Quando è stato analizzato successivamente dopo essere stato preparato usando lo stesso plasmide è stato rilevato.

† La concordanza positiva (PA) escludendo le identificazioni PolyTG/PolyT era del 100%.

§ Un eterozigote del campione sintetico per l'esone 8 è stato riportato come eterozigote per la variante CFTR dele22, 23. Ulteriori indagini hanno rivelato che questo risultato probabilmente è dipeso da un basso livello di contaminazione. Inoltre, per un secondo campione, i primer Sanger non hanno rilevato completamente la variante Q1463Q a causa di Indel a monte e a valle del sito della variante.

Tabella 23 Accuratezza della variante PolyTG/PolyT per il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Genotipo PolyTGPolyT	N. di campioni clinici	N. di campioni linee cellulari	N. di campioni sintetici	N. di mancate identificazioni	N. di identificazioni non riuscite*	% accuratezza
(TG)9(T)7/(TG)11(T)7	2	0	0	0	1	50,00
(TG)9(T)9/(TG)10(T)7	1	0	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)9	1	0	0	0	0	100

Genotipo PolyTGPolyT	N. di campioni clinici	N. di campioni linee cellulari	N. di campioni sintetici	N. di mancate identificazioni	N. di identificazioni non riuscite*	% accuratezza
(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	25	8	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	10	1	0	0	1	90,91
(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	7	6	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)7	< 13	0	0	0	1	92,31
(TG)11(T)5/(TG)11(T)7	6	0	0	1	0	83,33
(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	52	8	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9^	2	1	0	3	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
Totale		448		4	3	98,44

* I campioni non sono stati analizzati nuovamente.

^ Uno dei risultati discordanti proveniva dallo studio di riproducibilità. Il risultato PolyTG/PolyT per il campione era concordante su tutti i 18 replicati, ma discordante con il sequenziamento bidirezionale Sanger.

Riproducibilità

La riproducibilità del saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing è stata determinata attraverso uno studio condotto in cieco in 3 centri di sperimentazione con 2 operatori per ciascun centro. Due pannelli ben caratterizzati di 46 campioni ciascuno sono stati testati da ciascun operatore in ciascun centro per un totale di 276 risultati per operatore. Il pannello era costituito da una miscela di DNA genomico proveniente da linee cellulari linfoblastoidi con mutazioni note nel gene *CFTR*, oltre che da sangue deleucocitato con aggiunta di linee cellulari linfoblastoidi con mutazioni note nel gene *CFTR*. I campioni di sangue servivano per consentire l'incorporazione delle fasi di estrazione necessarie per preparare il gDNA utilizzato come input primario per il flusso di lavoro del saggio.

La percentuale dei campioni "pass", vale a dire il numero di campioni che hanno superato la metrica QC al primo tentativo, è stata del 99,7%. Tutti i risultati sono basati su test iniziali.

La concordanza positiva (PA) a livello di genotipo per tutte le varianti inclusa la variante PolyTG/PolyT era del 99,22% ed escludendo la variante PolyTG/PolyT era del 99,60%. La concordanza negativa (NA) per tutti i WT era del 99,70% e la concordanza complessiva (OA) per tutte le posizioni riportate era del 99,70%. La concordanza positiva (PA) per le varianti PolyTG/PolyT era del 97,83%.

Tabella 24 Riproducibilità del saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing (escluse le varianti PolyTG/PolyT)

Campione	Nome HGVS (o, in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Identificazioni non riuscite [€]	Mancate identificazioni	
1	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
1	c.1646G>A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
1	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1581A>G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1680-1G>A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.3870A>G	P1290P	6	18	6	5	6	0	1	94,44
2	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1477C>T	Q493X	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o, in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Identificazioni non riuscite [€]	Mancate identificazioni	
3	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
4	c.1408G>A	V470M	6	18	5	6	6	1	0	94,44
4	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	5	6	6	1	0	94,44
4	c.2052delA	2184delA	6	18	5	6	6	1	0	94,44
5	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.224G>A	R75Q	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.2562T>G	T854T	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.3472C>T	R1158X	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.366T>A	Y122X	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.625G>T	A209S	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
6	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.2051_2052delAAinsG	2183AA>G	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.223C>T	R75X	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.3846G>A	W1282X	6	18	6	5	6	0	1*	94,44

Campione	Nome HGVS (o, in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Identificazioni non riuscite [€]	Mancate identificazioni	
9	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.3140-26A>G	3272-26A>G	6	18	6	5	6	0	1*	94,44
10	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
11, 39	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.2002C>T	R668C	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2988+1G>A	3120+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.489+1G>T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
< 13	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
< 13	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
< 13	c.178G>T	E60X	6	18	6	6	6	0	0	100
< 13	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o, in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Identificazioni non riuscite [€]	Mancate identificazioni	
15	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.3080T>C	I1027T	6	18	6	6	6	0	0	100
17, 41	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
17, 41	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
17, 41	c.3528delC	3659delC	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.-4G>C	117120145	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.350G>A	R117H	12	36	12	12	12	0	0	100
19	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
19	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
19	c.579+1G>T	711+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
20, 43	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.254G>A	G85E	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.489+1G>T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1364C>A	A455E	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
22	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1679G>C	R560T	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o, in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Identificazioni non riuscite [€]	Mancate identificazioni	
22	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.3276C>A	Y1092X(C>A)	6	18	6	6	6	0	0	100
24, 45	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
24, 45	c.3909C>G	N1303K	12	36	12	12	12	0	0	100
24, 45	c.4046G>A	G1349D	12	36	12	12	12	0	0	100
25	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
25	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
27, 46	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1652G>A	G551D	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1657C>T	R553X	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
28	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.91C>T	R31C	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o, in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Identificazioni non riuscite [€]	Mancate identificazioni	
30	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.3485G>T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.1585-1G>A	1717-1G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.3484C>T	R1162X	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.1000C>T	R334W	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	6	18	6	6	6	0	0	100
35	c.1523T>G	F508C	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.254G>A	G85E	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.3454G>C	D1152H	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1007T>A	I336K	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.3705T>G	S1235R	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o, in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Identificazioni non riuscite [€]	Mancate identificazioni	
38	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.1727G>C	G576A	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2002C>T	R668C	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2057C>A	S686Y	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
47, 85	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2657+5G>A	2789+5G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
48, 86	c.54-5940_273+10250del21kb	CFTRdele2,3	12	36	12	11	12	1	0	97,22
48, 86	c.1408G>A	V470M	12	36	12	11	12	1	0	97,22
48, 86	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	11	12	1	0	97,22
49, 87	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1766+1G>A	1898+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.220C>T	R74W	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.3808G>A	D1270N	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.2012delT	2143delT	12	36	12	12	12	0	0	100
52	c.3744delA	3876delA	6	18	6	6	6	0	0	100
53, 90	c.3773_3774insT	3905insT	12	36	12	12	12	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o, in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Identificazioni non riuscite [€]	Mancate identificazioni	
54, 91	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
54, 91	c.262_263delTT	394delTT	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1519A>G	I507V	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.3080T>C	I1027T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
56	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.3154T>G	F1052V	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.3209G>A	R1070Q	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.2991G>C	L997F	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.3205G>A	G1069R	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.617T>G	L206W	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o, in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Identificazioni non riuscite [€]	Mancate identificazioni	
61	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.2260G>A	V754M	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.988G>T	G330X	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1040G>A	R347H	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
65	c.948delT	1078delT	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.532G>A	G178R	6	18	6	6	6	0	0	100
67	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
67	c.1647T>G	S549R (c.1647T>G)	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1646G>A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
69	c.2506G>T	D836Y	6	18	6	6	6	0	0	100
69	c.2537G>A	W846X	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.3485G>T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o, in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Identificazioni non riuscite [€]	Mancate identificazioni	
70	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.274G>T	E92X	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
72	c.1022_1023insTC	1154insTC	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
73	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1826A>G	H609R	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	0	1	94,44
74	c.1429C>T	P477S	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
75	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
75	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
75	c.1721C>A	P574H	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
76	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.425delT	F143LfsX10	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1364C>A	A455E	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o, in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Identificazioni non riuscite [€]	Mancate identificazioni	
77	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1581A>G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1680-1G>A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.3870A>G	P1290P	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.220C>T	R74W	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.3808G>A	D1270N	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1657C>T	R553X	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o, in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Identificazioni non riuscite [€]	Mancate identificazioni	
82	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.-4G>C	11720145	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.350G>A	R117H	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
Totale di tutte le varianti (PA)** (inclusi i dati PolyTG/PolyT nella Tabella 25)			2.580	7.740	2.562	2.553	2.565	37	23	99,22
Totale di tutti i WT (NA)			2.871.132	8.613.396	2.865.930	2.855.526	2.865.932	26.006	2	99,70
Totale di tutti i WT e varianti (OA)			2.873.712	8.621.136	2.868.492	2.858.079	2.868.497	26.043	25	99,70

[€] I campioni non sono stati analizzati nuovamente.

[^] Un replicato ciascuno dei campioni 5 e 75 ha registrato una percentuale di identificazione dello 0%. Ulteriori indagini indicavano che esisteva la possibilità che i campioni non fossero stati aggiunti alla piastra campioni prima della preparazione delle librerie.

* Durante la revisione, era probabile che i campioni 9 e 10 fossero stati scambiati dall'operatore prima della preparazione delle librerie.

** Escludendo le varianti PolyTG/PolyT, la concordanza positiva (PA) era del 99,60%.

Tabella 25 Riproducibilità PolyTG/PolyT per il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Pannello	Campione	Genotipo	N. di risultati		Concordanza identificazioni			Totale tutti i centri		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione	Mancate identificazioni	
A	1	(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	2	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	3	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	4	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%

Pannello	Campione	Genotipo	N. di risultati		Concordanza identificazioni			Totale tutti i centri		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione	Mancate identificazioni	
A	5	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	5	6	1	0	94,44%
A	6	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	7	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	8	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	9	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	10	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	11, 39	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	12, 40	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	< 13	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	14	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	15	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	5	6	1	0	94,44%
A	16	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	17, 41	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	18, 42	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	19	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	20, 43	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	21, 44	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	22	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	23	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	24, 45	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	25	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	26	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	27, 46	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	12	36	11	12	12	0	1	97,22%
A	28	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	29	(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	4	4	4	0	77,78%
A	30	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%

Pannello	Campione	Genotipo	N. di risultati		Concordanza identificazioni			Totale tutti i centri		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione	Mancate identificazioni	
A	31	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	32	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	33	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
A	34	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	35	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	36	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	37	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	38	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	47, 85	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	48, 86	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	11	11	12	2	0	94,44%
B	49, 87	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	50, 88	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	51, 89	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	52	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	53, 90	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	54, 91	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	55, 92	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	56	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	57	(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	58	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	59	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	60	(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	61	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	62	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	63	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	64	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%

Pannello	Campione	Genotipo	N. di risultati		Concordanza identificazioni			Totale tutti i centri		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione	Mancate identificazioni	
B	65	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	66	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	67	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	68	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	69	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	70	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	71	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	72	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	5	6	5	2	0	88,89%
B	73	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	74	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	75	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	5	6	1	0	94,44%
B	76	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	77	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	78	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	79	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	80	(TG)11(T)7/(TG)11(T)9	6	18	0	0	0	0	18*	0%
B	81	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	82	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	83	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	84	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
Totale varianti PolyTG/PolyT (PA)			552	1.656	537	540	543	17	19	97,83%

* Tutti i 18 campioni concordavano fra loro ma discordavano con il sequenziamento bidirezionale Sanger.

Estrazione del DNA

Tre diversi metodi di estrazione usati comunemente e disponibili in commercio, ossia estrazione mediante microsferi magnetiche, precipitazione alcolica e isolamento mediante colonna di gel di silice, sono stati valutati utilizzando sangue intero anticoagulato in K₂EDTA. Nel corso dello studio sono stati utilizzati complessivamente 14 campioni di sangue; due erano wild type mentre i rimanenti campioni erano portatori dei genotipi unici rappresentanti nove varianti diverse, inclusi varianti comuni e rare. Per i polimorfismi PolyTG/PolyT, sono stati inclusi campioni con (T)5-9 e (TG)10-12. I tre metodi di estrazione del DNA sono stati analizzati indipendentemente da due diversi operatori e ciascuno di loro ha eseguito tre corse per ciascun metodo di estrazione. Ciascuna estrazione è stata eseguita da ciascun operatore in giorni diversi. La concentrazione di DNA e il rapporto A260/A280 dei campioni di gDNA estratto sono stati determinati usando la spettrofotometria. La dimensione complessiva dei campioni per ciascun metodo di estrazione esaminato nello studio è stato pari a 168 (14 campioni x 2 operatori/metodo di estrazione x 3 corse/operatore x 2 replicati/campioni di gDNA estratto).

Metodo di estrazione	Numero di campioni analizzati	Percentuale di identificazione	Accuratezza	Percentuale di campioni "first pass" (primo passaggio)*
Precipitazione alcolica	168	> 99,99%	> 99,99%	100%
Isolamento su colonna di gel di silice	168	> 99,99%	> 99,99%	100%
Estrazione con microsferi magnetiche	168	> 99,99%	> 99,99%	100%

* La percentuale di campioni che presentano una percentuale di identificazione di > 99% nella prima corsa.

Input di DNA

L'intervallo di input di DNA del saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing è stato valutato eseguendo uno studio di diluizione in serie usando 14 campioni di DNA rappresentativi che contenevano 16 varianti univoche del gene della fibrosi cistica. Ciascun campione è stato analizzato in duplicati a nove livelli di input di DNA che andavano da 1.250 ng a 1 ng (1.250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng e 1 ng). Per determinare l'accuratezza, i genotipi dei campioni sono stati confrontati con i dati del sequenziamento bidirezionale Sanger e le delezioni sono state confrontate con il saggio PCR. 1.250 ng e 25 ng sono stati identificati, rispettivamente, come il limite superiore e inferiore per l'input di DNA in quanto presentavano una percentuale di 'first pass' del campione di ≥ 95 (100% di accuratezza e percentuale di identificazione).

Gli input di DNA di 1.250 ng, 250 ng e 100 ng sono stati ulteriormente analizzati con quattro campioni di DNA rappresentativi ed almeno 20 replicati per ciascun livello di input di DNA per ciascun campione ($n=4 \times 20=80$ campioni), mentre il legame inferiore di 25 ng è stato analizzato con 14 campioni, 20 replicati per ciascun campione ($n=14 \times 20=280$ campioni). L'accuratezza e la percentuale di "first pass" dei campioni sono risultati pari al 100% a tutti i livelli di input di DNA.

Sostanze interferenti

Per valutare l'impatto delle sostanze interferenti sul sistema MiSeqDx Cystic Fibrosis Illumina, le prestazioni del saggio sono state valutate in presenza e in assenza di potenziali sostanze interferenti. Nello studio sono stati testati sedici campioni di sangue intero con genotipi CF unici. Quattro sostanze interferenti endogene (bilirubina, colesterolo, emoglobina e trigliceridi) sono state testate aggiungendole ai campioni di sangue prima dell'estrazione del DNA. I limiti di concentrazione di ciascuna sostanza sono riportati nella tabella seguente. Inoltre, per valutare l'interferenza risultante dalla raccolta del sangue (prelievo breve) EDTA è stato aggiunto ai campioni di sangue e, per valutare l'interferenza risultante dalla preparazione dei campioni, è stato aggiunto al DNA genomico purificato un tampone di lavaggio finale, ottenuto mediante un metodo di isolamento su colonna di gel di silice.

Il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing ha raggiunto una percentuale di identificazione del 100% per tutti i campioni analizzati e una riproducibilità del 100% nell'identificazione dei genotipi tra i campioni in presenza e in assenza delle sostanze interferenti. Non è stata osservata alcuna interferenza da parte di qualsiasi interferente endogeno o esogeno.

Per valutare l'impatto dell'interferenza degli index primer in multiplex, è stato eseguito uno studio di contaminazione incrociata usando due campioni, ciascuno con genotipi omozigoti univoci in quattro diverse posizioni genomiche e due rispettivi index primer. Non è stato osservato alcun cambiamento nell'identificazione delle varianti con livelli di contaminazione inferiori al 40%. Il genotipo del campione è diventato eterozigote quando i livelli di contaminazione erano $\geq 40\%$.

Sostanza del test	Numero totale di replicati	Concentrazione testata nel sangue (limite superiore)	Concentrazione testata nel sangue (limite inferiore)	Percentuale di identificazione
Bilirubina	16	684 $\mu\text{mol/l}$	137 $\mu\text{mol/l}$	100%
Colesterolo	16	13 mmol/l	2,6 mmol/l	100%
Emoglobina	16	2 g/l	0,4 g/l	100%
Trigliceride	16	37 mmol/l	7,4 mmol/l	100%
EDTA	16	7,0 mg/ml	2,8 mg/ml	100%

Equivalenza delle prestazioni con il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina

Il saggio TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing (TruSight CFCS) utilizza lo stesso flusso di lavoro per la preparazione delle librerie e gli stessi reagenti del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis (MiSeqDx CFCS) Illumina. TruSight CFCS utilizza MiSeqDx Reagent Kit v3 mentre MiSeqDx CFCS utilizza i reagenti di sequenziamento inclusi con il saggio. Per dimostrare l'equivalenza tra TruSight CFCS e MiSeqDx CFCS, i risultati ottenuti da otto corse TruSight CFCS sono stati confrontati con una singola corsa MiSeqDx CFCS come gold standard. Le corse TruSight CFCS sono state eseguite a una processività di 96 campioni (la processività massima di campioni per TruSight CFCS) e le corse MiSeqDx CFCS a una processività di 48 campioni (processività massima di campioni per MiSeqDx CFCS). Le fonti di variabilità inclusi nelle corse TruSight CFCS includevano tre eventi di preparazione delle librerie (ciascuno con un lotto TruSight Cystic Fibrosis univoco), tre operatori, tre strumenti MiSeqDx e tre lotti di MiSeqDx Reagent Kit v3.

Le identificazioni delle varianti ottenute dalle corse TruSight CFCS sono state confrontate con le identificazioni ottenute dalla corsa MiSeqDx CFCS. In ogni corsa TruSight CFCS sono stati inclusi 47 campioni univoci con 2-3 replicati per campione (95 campioni di DNA e 1 NTC per corsa). Per la corsa MiSeqDx CFCS sono stati sequenziati gli stessi 47 campioni come singoli (47 campioni di DNA + 1 NTC per corsa). Lo stesso pannello di campioni includeva campioni di DNA Coriell estratti da linee cellulari immortalizzate e campioni rappresentanti tutti gli alleli delle 23 mutazioni ACMG, le varianti delezione-inserzione (incluse le inserzioni/delezioni in regioni omopolimeriche e inserzioni con delezione nella stessa regione), varianti omozigote, varianti omozigote composte, una delle ampie delezioni target, varianti PolyTG/PolyT, varianti di singolo nucleotide e un campione con nessuna variante rilevata. La [Tabella 26](#) fornisce un riepilogo dei risultati per genotipo. La [Tabella 27](#) mostra la concordanza tra i saggi per tipo di variante. La concordanza complessiva (totale) tra i saggi era $> 99,99\%$.

Tabella 26 Prestazioni dell'identificazioni delle varianti del saggio TruSight CFCS-Variant confrontato con il saggio MiSeqDx CFCS-Variant

		Saggio MiSeqDx CF Clinical				
		Variante HOM	Variante HET	Wild type	Nessuna identificazione	Totale
Saggio TruSight CF Clinical	Variante HOM	551	-	-	-	551
	Variante HET	-	2.664	-	-	2.664
	Wild type	-	-	4.426.182	-	4.426.182
	Nessuna identificazione	-	-	58	-	58
	Totale	551	2.664	4.426.420	-	4.429.455

Tabella 27 Prestazioni per tipo di variante del saggio TruSight CF Clinical Sequencing confrontato con il saggio MiSeqDx CF Clinical Sequencing

Tipo di variante	Identificazioni corrette	Identificazioni errate	Nessuna identificazione	Concordanza con il saggio MiSeqDx CF Clinical Sequencing
SNV	2.684	0	0	100,00% (2.684/2.684)
DEL	18	0	0	100,00% (18/18)
DIV	513	0	0	100,00% (513/513)
PolyTG/PolyT	847	1	3	99,88% (847/851)
Nessuna (wild type)	4.426.182	0	58	100,00% (4.426.182/4.426.240)
Totale	4.430.244	1	61	>99,99% (4.430.244/4.430.306)

È stata osservata una sola identificazione discordante tra TruSight CFCS e MiSeqDx CFCS. Questa identificazione errata era una variante PolyTG/PolyT. La **Tabella 28 a pagina 91** mostra un riepilogo sulla concordanza PolyTG/PolyT.

Tabella 28 Prestazioni dell'identificazioni delle varianti PolyTG/PolyT del saggio TruSight CF Clinical Sequencing confrontato con il saggio MiSeqDx CF Clinical Sequencing

		Tabella del saggio MiSeqDx CF Clinical												
		(TG)10 (T)7/ (TG)10 (T)7	(TG)10 (T)7/ (TG)10 (T)9	(TG)10 (T)7/ (TG)12 (T)5	(TG)10 (T)7/ (TG)12 (T)7	(TG)10 (T)9/ (TG)10 (T)9	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	(TG)11 (T)7/ (TG)10 (T)7	(TG)11 (T)7/ (TG)10 (T)9	(TG)11 (T)7/ (TG)11 (T)7	(TG)11 (T)7/ (TG)12 (T)7	(TG)12 (T)5/ (TG)12 (T)5	Nessuna identificazione	Totale
Saggio TruSight CF Clinical	(TG)10(T)7/ (TG)10(T)7	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
	(TG)10(T)7/ (TG)10(T)9	-	189	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	189
	(TG)10(T)7/ (TG)12(T)5	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18
	(TG)10(T)7/ (TG)12(T)7	-	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-	-	18
	(TG)10(T)9/ (TG)10(T)9	-	-	-	-	72	-	-	-	-	-	-	-	72
	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-	17
	(TG)11(T)7/ (TG)10(T)7	-	-	-	-	-	-	126	-	-	-	-	-	126
	(TG)11(T)7/ (TG)10(T)9	-	-	-	-	-	-	-	249	-	-	-	-	249
	(TG)11(T)7/ (TG)11(T)7	-	-	-	-	-	-	-	-	72	-	-	-	72
	(TG)11(T)7/ (TG)12(T)7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36	-	-	36
	(TG)12(T)5/ (TG)12(T)5	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
	Nessuna identificazione	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3
Totale	50	189	18	18	72	18	126	252	72	36	-	-	851	

Bibliografia

- 1 Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, et al. (2004) Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genetics in Medicine* 6(5): 387–391.
- 2 Committee on Genetics. (April 2011) The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee Opinion. Update on Carrier Screening for Cystic Fibrosis 486: 1–4.
- 3 Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, Farrell PM. (2002) Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations—Correlation With Incidence Data and Application to Screening. *Human Mutation* 19:575–606.
- 4 Moskowitz SM, Chmiel JF, Steman DL, Cheng E, Gibson RL, et al. (2008) Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genetics in Medicine* 10(12):851–868.
- 5 Moskowitz SM, Chmiel JF, Steman DL, Cheng E, Cutting GR. CFTR-related disorders. Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington; 2008. Disponibile alla pagina Web www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250. [Online] Aggiornato il 19 febbraio, 2008.
- 6 Katkin JP. (2012) Cystic fibrosis: Clinical manifestations and diagnosis. Disponibile alla pagina Web www.uptodate.com. [Online] 7 dicembre 2012.
- 7 Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, et al. 2008 Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 153(2): S4–S14.
- 8 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2010.
- 9 Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). Disponibile alla pagina Web www.genet.sickkids.on.ca/app. [Online] Agosto 2013.
- 10 Rohlf EM, Zhou Z, Heim R, Nagan N, Rosenblum L, et al. (2011) Cystic Fibrosis Carrier Testing in an Ethnically Diverse US Population. *Clinical Chemistry*; 57(6): 841–848.
- 11 Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). Disponibile alla pagina Web www.cftr2.org. [Online] Agosto 2013.
- 12 The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) Project. Disponibile alla pagina Web www.nacconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf. [Online] Presentato da Gary Cutting a nome del progetto CFTR2 al 25th Annual North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC) sponsorizzato da Cystic Fibrosis Foundation. 4 novembre 2011. Anaheim, CA.
- 13 Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, et al. (2013) Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nature Genetics* 45 (10): 1160–1167.
- 14 Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. (March/April 2001) Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. *Genetics in Medicine* 3(2): 149–154.
- 15 Castellani C, Cuppens H, Macek H Jr, Cassiman JJ, Kerem E, et al. (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cystic Fibrosis* 7:179–196.
- 16 Pratt VM, Caggana M, Bridges C, Buller AM, DiAntonio L, et al. (May 2009) Development of Genomic Reference Materials for Cystic Fibrosis Genetic Testing. *Journal of Molecular Diagnostics* 11(3): 186–193.
- 17 Amos J, Feldman GL, Grody WW, Monaghan K, Palomaki GE, et al. (2008 Edition, Revised 03/2011) American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Clinical Genetic Laboratories.
- 18 Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine*. *Genetics in Medicine* 15(9): 733–747.

Brevetti e marchi di fabbrica

Questo documento e il suo contenuto sono di proprietà di Illumina, Inc. e delle aziende a essa affiliate ("Illumina") e sono destinati esclusivamente a uso contrattuale da parte dei clienti di Illumina per quanto concerne l'utilizzo dei prodotti qui descritti con esclusione di qualsiasi altro scopo. Questo documento e il suo contenuto non possono essere usati o distribuiti per altri scopi e/o in altro modo diffusi, resi pubblici o riprodotti, senza previa approvazione scritta da parte di Illumina. Mediante questo documento Illumina non trasferisce alcuna licenza sui propri diritti su brevetti, marchi di fabbrica, copyright, o diritti secondo il diritto consuetudinario, né alcun diritto simile di alcun terzo.

Al fine di assicurare un uso sicuro e corretto dei prodotti qui descritti, le istruzioni riportate in questo documento devono essere scrupolosamente ed esplicitamente seguite da personale qualificato e adeguatamente formato. Leggere e comprendere a fondo tutto il contenuto di questo documento prima di usare tali prodotti.

LA LETTURA INCOMPLETA DEL CONTENUTO DEL PRESENTE DOCUMENTO E IL MANCATO RISPETTO DI TUTTE LE ISTRUZIONI IVI CONTENUTE POSSONO CAUSARE DANNI AL/I PRODOTTO/I, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI E RENDERANNO NULLA QUALSIASI GARANZIA APPLICABILE AL/AI PRODOTTO/I.

ILLUMINA NON SI ASSUME ALCUNA RESPONSABILITÀ DERIVANTE DALL'USO IMPROPRIO DEL/DEI PRODOTTO/I QUI DESCRITTI (INCLUSI SOFTWARE O PARTI DI ESSO).

© 2021 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.

AMPure, Beckman e Beckman Coulter sono marchi di fabbrica o marchi registrati di Beckman Coulter, Inc.

Informazioni di contatto



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Paesi Bassi

Sponsor Australiano

Illumina Australia Pty Ltd
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
Australia

Etichettatura del prodotto

Per un riferimento completo dei simboli che si trovano sulla confezione del prodotto e sull'etichettatura, fare riferimento alla legenda dei simboli per il kit in uso alla pagina Web support.illumina.com.