

# Saggio MiSeqDx<sup>®</sup> Cystic Fibrosis 139-Variant

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

N. di catalogo DX-102-1004: 2 corse, fino a 96 campioni per kit

N. di catalogo DX-102-1003: 20 corse, fino a 960 campioni per kit

## Uso previsto

Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina 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 comprendono quelle raccomandate nel 2004 dall'American College of Medical Genetics (ACMG)<sup>1</sup> e nel 2011 dall'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)<sup>2</sup>. Il test è previsto per lo screening dei portatori in adulti in età riproduttiva, in 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 sullo strumento MiSeqDx Illumina.

## Riepilogo e spiegazione del saggio

### Descrizione clinica

La fibrosi cistica (CF) è una delle malattie genetiche più comuni nel mondo occidentale ed è la malattia autosomica recessiva potenzialmente letale più comune nella popolazione bianca non ispanica<sup>3,7</sup>. La fibrosi cistica incide sulla viscosità delle secrezioni mucose e influenza l'epitelio del tratto respiratorio, del pancreas, dell'intestino, del sistema epatobiliare, del tratto genitale maschile nonché le ghiandole sudoripare, causando una complessa patologia multisistemica e multiorgano<sup>4,6</sup> nella quale i polmoni sono il sistema d'organi principalmente associato a morbidità e mortalità<sup>8</sup>. In molti casi, un declino nutrizionale preannuncia una progressione della malattia polmonare dovuta a CF; pertanto, un elemento fondamentale delle attuali strategie di intervento è la diagnosi precoce tramite screening dei neonati<sup>7</sup> che favorisce un accesso tempestivo ai servizi medici fondamentali e consente di ottenere il miglior risultato possibile per gli individui affetti dalla patologia<sup>4,7</sup>. Benché vi siano differenze tra i sessi per quanto riguarda la sopravvivenza e venga riferita una sopravvivenza mediana superiore per gli uomini rispetto alle donne, negli Stati Uniti la sopravvivenza mediana generale è di 38,3 anni<sup>8</sup>.

### 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 distribuiti su oltre 230 kb<sup>4</sup>. Un mRNA di 6,5 kb prodotto dall'allele normale codifica il gene *CFTR*, una proteina integrale di 1.490 aminoacidi situata sulla membrana che funziona come canale di cloro regolato nelle cellule epiteliali di più organi<sup>4,5</sup>. Attualmente sono state descritte oltre 1.900 varianti del gene *CFTR*. Per la maggior parte si tratta di mutazioni puntiformi<sup>9</sup>. La variante del gene *CFTR* più comune è l'allele F508del<sup>5</sup> che rappresenta quasi il 70% di tutte le varianti del gene *CFTR*<sup>3</sup>. Tuttavia altre varianti comuni del gene *CFTR* spesso determinano un fenotipo CF e altre patologie correlate a *CFTR*<sup>3-5</sup>.

La fibrosi cistica ha un'incidenza di malattia stimata pari a un caso ogni 2.000-4.000 nati vivi e una prevalenza di circa 30.000 individui nella popolazione statunitense<sup>4</sup>. Si verifica in tutte le etnie e razze con frequenze diverse: un caso ogni 3.000 caucasici, un caso ogni 9.200 ispano-americani, un caso ogni 10.900 nativi americani, un caso ogni 15.000 afroamericani e un caso ogni 31.000 asioamericani<sup>4,6</sup>. La [Tabella 1](#) fornisce le stime attuali della frequenza dei portatori della mutazione del gene CFTR in base all'etnia negli Stati Uniti, basate su una coorte di 364.890 individui testati per il portatore senza anamnesi familiare di fibrosi cistica.

**Tabella 1** Frequenza generale dei portatori della mutazione della fibrosi cistica in diversi gruppi etnici negli Stati Uniti<sup>10</sup>

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

## 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.<sup>11,12</sup> CFTR2 mira a fornire informazioni complete e riviste da esperti sulle varianti funzionali e cliniche del gene *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 mondo<sup>13</sup> 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.<sup>11,13</sup> Le caratteristiche cliniche, come concentrazione di cloro nel sudore (% FEV1 prevista) e stato del pancreas sono stati analizzati 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 (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 MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant sono state appositamente scelte perché rappresentano il gruppo completo di varianti convalidate clinicamente 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)<sup>14</sup> 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 MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant sono fornite nella [Tabella 2](#).

**Tabella 2** Riepilogo delle varianti per il saggio MiSeqDx 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. Grassetto=ACMG-23; Corsivo=riportata condizionatamente]

M1V (c.1A>G)	T338I (c.1013C>T)	<b>R553X (c.1657C&gt;T)</b>	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)	<b>R560T (c.1679G&gt;C)</b>	R1066C (c.3196C>T)
E60X (c.178G>T)	R347H (c.1040G>A)	R560K (c.1679G>A)	R1066H (c.3197G>A)
P67L (c.200C>T)	<b>R347P (c.1040G&gt;C)</b>	1811+1.6kbA>G (c.1679+1.6kbA>G)	L1077P (c.3230T>C)
R75X (c.223C>T)	R352Q (c.1055G>A)	1812-1 G>A (c.1680-1G>A)	W1089X (c.3266G>A)
<b>G85E (c.254G&gt;A)</b>	1213delT (c.1081delT)	E585X (c.1753G>T)	Y1092X(C>A) (c.3276C>A)
394delTT (c.262_263delTT)	1248+1G>A (c.1116+1G>A)	<b>1898+1G&gt;A (c.1766+1G&gt;A)</b>	Y1092X(C>G) (c.3276C>G)
405+1 G>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)	<b>2184delA (c.2052delA)</b>	<b>R1162X (c.3484C&gt;T)</b>
Q98X (c.292C>T)	1461ins4 (c.1329_1330insAGAT)	2184insA (c.2052_2053insA)	<b>3659delC (c.3528delC)</b>
457TAT>G (c.325_327delTATinsG)	<b>A455E (c.1364C&gt;A)</b>	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)
<b>R117H (c.350G&gt;A)</b>	S466X (C>G) (c.1397C>G)	L732X (c.2195T>G)	3791delC (c.3659delC)
Y122X (c.366T>A)	L467P (c.1400T>C)	2347delG (c.2215delG)	<b>3849+10kbC&gt;T (c.3717+12191C&gt;T)</b>
574delA (c.442delA)	1548delG (c.1418delG) <sup>†</sup>	R764X (c.2290C>T)	G1244E (c.3731G>A)
<b>621+1G&gt;T (c.489+1G&gt;T)</b>	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)

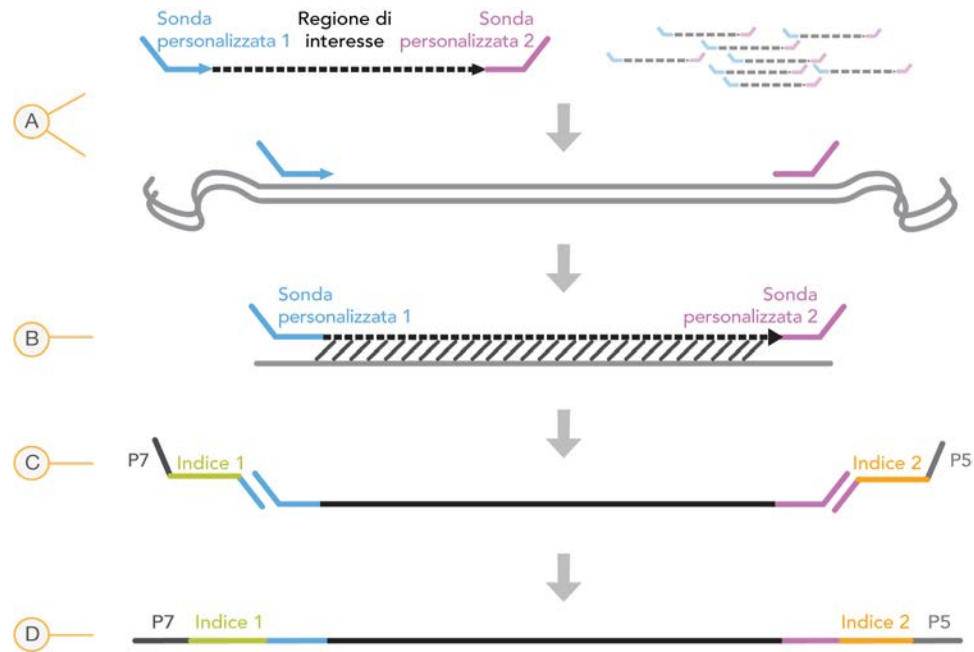
711+1G>T (c.579+1G>T)	<b>I507del (c.1519_1521delATC)</b>	E831X (c.2491G>T)	<b>W1282X (c.3846G&gt;A)</b>
711+3A>G (c.579+3A>G)	<b>F508del (c.1521_1523delCTT)</b>	W846X (c.2537G>A)	4005+1G>A (c.3873+1G>A)
711+5 G>A (c.579+5G>A)	1677delTA (c.1545_1546delTA)	R851X (c.2551C>T)	4016insT (c.3884_3885insT)
712-1 G>T (c.580-1G>T)	V520F (c.1558G>T)	2711delT (c.2583delT)	<b>N1303K (c.3909C&gt;G)</b>
H199Y (c.595C>T)	Q525X (c.1573C>T) <sup>†</sup>	<b>2789+5G&gt;A (c.2657+5G&gt;A)</b>	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)	<b>1717-1G&gt;A (c.1585-1G&gt;A)</b>	L927P (c.2780T>C)	CFTRdele22,23 (c.3964-78_4242+577del)
Q220X (c.658C>T)	<b>G542X (c.1624G&gt;T)</b>	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&gt;G)</i>
G330X (c.988G>T)	S549R (c.1647T>G)	3120G>A (c.2988G>A)	<i>I507V (c.1519A&gt;G)</i>
<b>R334W (c.1000C&gt;T)</b>	<b>G551D (c.1652G&gt;A)</b>	<b>3120+1G&gt;A (c.2988+1G&gt;A)</b>	<i>F508C (c.1523T&gt;G)</i>
I336K (c.1007T>A)	Q552X (c.1654C>T)	3121-1G>A (c.2989-1G>A)	

<sup>†</sup> Classificato nel database CFTR<sup>12</sup> come una variante che causa la fibrosi cistica, mentre Sosnay<sup>13</sup> 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.

## Principi della procedura

Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina comporta due procedure principali. La prima consiste nel preparare i campioni per il sequenziamento, un'operazione chiamata preparazione delle librerie. La preparazione delle librerie consiste di quattro fasi principali: ibridazione, estensione-ligazione, amplificazione mediante PCR e normalizzazione della libreria. La seconda procedura consiste nel sequenziare il campione preparato mediante la chimica di sequenziamento mediante sintesi (Sequencing By Synthesis, SBS) su MiSeqDx.

## Preparazione delle librerie



- A Ibridazione:** la prima fase consiste nell'ibridare un pool di oligonucleotidi a monte e a valle specifici per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant 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 affiancati da sequenze necessarie per l'amplificazione.
- C Amplificazione mediante PCR:** la terza fase consiste nell'amplificazione dei prodotti dell'estensione-ligazione mediante primer che aggiungono sequenze d'indice per il multiplex campioni, 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 pool finale di librerie. Al termine di questo processo, il 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 (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 assegnate durante l'analisi primaria vengono elaborate per generare informazioni su ogni campione. Il software MiSeq Reporter o 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 quelle determinate posizioni nel genoma di riferimento.

Sia MiSeq Reporter che Local Run Manager dispongono delle medesime funzioni di analisi dei campioni e di creazione di report. La differenza principale tra i due software è il metodo con cui si interfacciano con lo strumento MiSeqDx.

Per maggiori informazioni sulle differenze e su come determinare il software in suo, vedere [Metodi per interfacciare lo strumento MiSeqDx a pagina 6](#).

- **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 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, MiSeq Reporter o Local Run Manager genera i file dell'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 MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant, un algoritmo con matrice a banda di Smith-Waterman allinea le sequenze per determinare le regioni simili tra le sequenze.
- **Identificazioni 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 MiSeqDxCF139VariantAssay.txt.

Per maggiori informazioni sul flusso di lavoro dell'analisi, vedere le guide relative ai software di analisi installati su MiSeqDx. Per MiSeq Reporter, vedere la *Guida di consultazione del software MiSeq Reporter (documento n. 15038356)*. Per Local Run Manager, vedere la *Guida di consultazione del software Local Run Manager per MiSeqDx (documento n. 1000000011880)* e la *Guida al flusso di lavoro del modulo di analisi Local Run Manager CF 139 Variant (documento n. 1000000012184)*.

## Metodi per interfacciare lo strumento MiSeqDx

Per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant sono disponibili due diversi metodi per interfacciare lo strumento MiSeqDx. Il metodo originario utilizza il software MiSeq Reporter, assieme a Illumina Worklist Manager (IWM) e a Illumina User Management Software. Il nuovo metodo utilizza il software Local Run Manager.

Sia MiSeq Reporter che Local Run Manager dispongono delle medesime funzioni di analisi dei campioni e di creazione di report.

Funzioni software	Originario	Nuovo
Impostazione di una corsa per lo strumento MiSeqDx	Illumina Worklist Manager (IWM)	Local Run Manager
Impostazione e monitoraggio dei campioni	Illumina Worklist Manager (IWM)	Local Run Manager
Controllo dell'accesso utente	Software Illumina User Management	Local Run Manager

Funzioni software	Originario	Nuovo
Esecuzione dell'analisi secondaria	MiSeq Reporter	Local Run Manager
Generazione di report	MiSeq Reporter	Local Run Manager

Attenersi a questa procedura per determinare se è in uso Local Run Manager.

- 1 Accedere in remoto allo strumento MiSeqDx.
- 2 Quando suggerito dal software, eseguire il login.
- 3 Assicurarsi che venga visualizzato "Local Run Manager" nella parte superiore della schermata.



#### NOTA

Se al momento dell'accesso da remoto il software non suggerisce di eseguire il login, è in uso MiSeq Reporter.

## Limiti della procedura

- 1 Per uso diagnostico *in vitro*. I risultati ottenuti usando il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina dovrebbero essere usati e interpretati nel contesto di una valutazione clinica completa.
- 2 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.
- 3 La frequenza delle varianti identificate mediante questo saggio varia fra le diverse popolazioni.
- 4 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.
- 5 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, dovrebbero 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 sulla variante R117H.
- 6 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 identificazioni errata dello 0,9% (4/448) per i risultati PolyTG/PolyT dimostrando una discrepanza  $\pm 1$  TG quando confrontato con il sequenziamento bidirezionale Sanger ([Tabella 18](#)).

## Componenti del prodotto

La piattaforma MiSeqDx Illumina è composto da:

- Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant (n. di catalogo DX-102-1004 o DX-102-1003)
- Strumento MiSeqDx (n. di catalogo DX-410-1001)

## Reagenti

### Reagenti forniti

I reagenti per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina sono forniti da Illumina. Il n. catalogo DX-102-1003 è stato configurato per 20 corse con un massimo di 48 campioni per corsa (fino a 960 campioni totali). Il n. catalogo DX-102-1004 è stato configurato per due corse con un massimo di 48 campioni per corsa (fino a 96 campioni totali).

## Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant, scatola 1

Tabella 3 Scatola 1A Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità		Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Pool di oligonucleotidi per il saggio CF 139-Variant	10 provette	1 provetta	600 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente oligonucleotidi mirati al gene <i>CFTR</i>	tra -25 °C e -15 °C
Tampone di ibridazione	10 provette	1 provetta	4,32 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e formammide	tra -25 °C e -15 °C
Extension-Ligation Mix	10 provette	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
Primer indice A (A501) - H (A508)	10 provette per primer	1 provetta per primer	192 µl	Primer per PCR con sequenze d'indice e adattatori di sequenziamento	tra -25 °C e -15 °C
Primer indice 1 (A701) - 12 (A712)	10 provette per primer	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	10 provette	1 provetta	56 µl	DNA polimerasi proprietaria	tra -25 °C e -15 °C
Master Mix per PCR	10 provette	1 provetta	2,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e dNTP	tra -25 °C e -15 °C

Tabella 4 Scatola 1B Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità		Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Diluyente di normalizzazione della libreria	10 provette	1 provetta	4,6 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanol e formammide	tra -25 °C e -15 °C
Tampone di diluizione libreria	10 provette	1 provetta	4,5 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra -25 °C e -15 °C
Campione di controllo interno PhiX	1 provetta	1 provetta	10 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente DNA genomico PhiX	tra -25 °C e -15 °C

## Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant, scatola 2

Tabella 5 Scatola 2 Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità		Contenuto	Conservazione
	DX-102-1003	DX-102-1004		
Cartuccia di reagenti MiSeqDx per il saggio CF 139-Variant	20 cartucce	2 cartucce	Cartuccia monouso che contiene i reagenti per la generazione di cluster e i reagenti per il sequenziamento da utilizzarsi con MiSeqDx, compresi formammide, 2-mercaptoetanol e < 2% DMSO	tra -25 °C e -15 °C



## Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant, scatola 3

Tabella 6 Scatola 3A Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità		Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Tampone di lavaggio stringente	10 flaconi	1 flacone	24 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	tra 2 °C e 8 °C
Tampone di lavaggio universale	10 provette	1 provetta	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	tra 2 °C e 8 °C

Tabella 7 Scatola 3B Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità		Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Microsfere per la pulizia della PCR	10 provette	1 provetta	5 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente microsfere paramagnetiche in fase solida e polietilene glicole	tra 2 °C e 8 °C
Lavaggio di normalizzazione della libreria	20 provette	2 provette	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	tra 2 °C e 8 °C
Microsfere della libreria	10 provette	1 provetta	1,2 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente microsfere paramagnetiche in fase solida	tra 2 °C e 8 °C
Cella a flusso MiSeqDx per il saggio CF 139-Variant	20 contenitori	2 contenitori	1 cella a flusso	Substrato di vetro con oligonucleotidi legati covalentemente	tra 2 °C e 8 °C

## Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant, scatola 4

Tabella 8 Scatola 4 Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità		Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
	DX-102-1003	DX-102-1004			
MiSeqDx SBS Solution (PR2) per il saggio CF 139-Variant	20 flaconi	2 flaconi	353,1 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 2 °C e 8 °C

## Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant, scatola 5

Tabella 9 Scatola 5 Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità		Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Piastra filtro	20 piastre	2 piastre	N/A	Piastra di microtitolazione in polipropilene con una membrana in polietersulfone modificata	tra 15 °C e 30 °C

Tabella 10 Scatola 5 Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità		Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Tampone di eluizione	10 provette	1 provetta	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C
Tampone di conservazione libreria	10 provette	1 provetta	3,5 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C

## Reagenti richiesti, non forniti

### Reagenti pre-amplificazione

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

### Reagenti post-amplificazione

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

## Conservazione e manipolazione

- 1 Per temperatura ambiente si intende la temperatura compresa tra 15 °C e 30 °C.
- 2 I reagenti elencati di seguito sono spediti congelati e rimangono stabili se conservati a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C fino alla data di scadenza specificata.
  - Pool di oligonucleotidi per il saggio CF 139-Variant
  - Tampone di ibridazione
  - Extension-Ligation Mix
  - Primer indice A (A501) - H (A508)
  - Primer indice 1 (A701) - 12 (A712)
  - PCR polimerasi
  - Master Mix per PCR
  - Diluente di normalizzazione della libreria
  - Tampone di diluizione libreria
  - Campione di controllo interno PhiX
  - Cartuccia di reagenti MiSeqDx per il saggio CF 139-Variant

A eccezione della cartuccia di reagenti, i reagenti rimangono stabili per un massimo di 6 cicli di congelamento/scongelo effettuati prima della data di scadenza specificata.

Non ricongelare la cartuccia di reagenti una volta scongelata. Può essere conservata per un massimo di sei ore a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

- 3 I reagenti elencati di seguito sono spediti refrigerati e rimangono stabili se conservati a una temperatura fra 2 °C e 8 °C fino alla data di scadenza specifica.
  - Tampone di lavaggio stringente
  - Tampone di lavaggio universale
  - Microsfere per la pulizia della PCR
  - Microsfere della libreria
  - Lavaggio di normalizzazione della libreria

- MiSeqDx SBS Solution (PR2) per il saggio CF 139-Variant
  - Cella a flusso MiSeqDx per il saggio CF 139-Variant
- 4 I reagenti elencati di seguito sono spediti a temperatura ambiente e rimangono stabili se conservati a tale temperatura fino alla data di scadenza specificata.
    - Tampone di eluizione
    - Piastra filtro
    - Tampone di conservazione della libreria
  - 5 Cambiamenti nell'aspetto fisico dei reagenti forniti possono indicare un deterioramento dei materiali. Non utilizzare i reagenti se si dovessero verificare tali cambiamenti (ad es., variazioni evidenti nel colore del reagente o opacità visibile con contaminazione microbica).
  - 6 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, quindi ispezionare visivamente per accertarsi che non vi sia presenza di precipitati.
  - 7 Nella manipolazione delle microsfele per la pulizia della PCR e delle microsfele della libreria attenersi alle migliori pratiche riportate di seguito:
    - Le microsfele non devono mai essere congelate.
    - Portarle a temperatura ambiente.
    - Immediatamente prima dell'uso, agitarle bene finché sospensione e colore appaiono omogenei.
    - Dopo aver aggiunto le microsfele miscelare bene il campione pipettando su e giù dieci volte. Per miscelare il campione è possibile utilizzare uno shaker.
    - Incubare la miscela di microsfele/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 surnatante, facendo attenzione a non toccare le microsfele separate.
  - 8 La piastra di amplificazione mediante PCR può restare sul termociclatore per tutta la notte, oppure può essere conservata ad una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per un massimo di due giorni. Prima di conservare la piastra a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C sigillarla bene.
  - 9 Non congelare il reagente delle microsfele della libreria o miscelarlo con il reagente del diluente di normalizzazione della libreria se non vengono utilizzati immediatamente.
  - 10 La libreria di ampliconi diluita può essere conservata a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 14 giorni.
  - 11 Caricare il pool di ampliconi diluiti sulla cartuccia di reagenti dopo la denaturazione.

## Apparecchiatura e materiali

### Apparecchiatura e materiali di consumo forniti, venduti separatamente

- 1 **Strumento MiSeqDx**, n. di catalogo DX-410-1001
- 2 **TruSeq Index Plate Fixture Kit**, n. di catalogo FC-130-1005
- 3 **TruSeq Index Plate Fixture & Collar Kit**, n. di catalogo FC-130-1007
- 4 **Tappi sostitutivi per adattatore indice**, n. di catalogo DX-502-1003

### Apparecchiatura e materiali richiesti, non forniti

#### Apparecchiatura e materiali per pre-amplificazione

- 1 **Blocco termico**: è necessario un blocco termico per una piastra a 96 pozzetti. Il blocco termico deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione. Sono accettabili i blocchi termici con coperchi riscaldati.
  - Intervallo di temperatura: ambiente da +5 °C a 99 °C
  - Regolazione della temperatura: ± 0,1 °C a 37 °C; ± 0,4 °C a 60 °C
- 2 **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
- 3 **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 × g).
  - 4 **Pipette di precisione:** è necessaria una serie 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 stabilito.
  - 5 **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 piastre PCR appropriato
    - Punte di pipette dotate di barriera aerosol

#### Apparecchiatura e materiali per post-amplificazione

- 1 **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
- 2 **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
- 3 **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 × g) è accettabile.
- 4 **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:  $\pm 0,1$  °C a 37 °C;  $\pm 0,4$  °C a 60 °C
- 5 **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.
- 6 **Pipette di precisione:** è necessaria una serie 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 stabilito.
- 7 **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
- Provette per microcentrifuga Eppendorf (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 di pipette dotate di barriera aerosol

## Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni



### NOTA

Manipolare tutti i campioni come agenti potenzialmente infettivi.

- 1 Possono essere utilizzati campioni di sangue intero prelevati in provette K<sub>2</sub>EDTA.
- 2 I campioni di sangue intero possono essere conservati per non più di sette 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.
- 3 I campioni di sangue intero possono essere trasportati per un massimo di sette 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 fra -25 °C e -15 °C. Il trasporto di sangue intero deve essere conforme alle regolamentazioni nazionali, federali, statali o locali per il trasporto di agenti eziologici.
- 4 Non sono stati osservati eventi avversi sulle prestazioni del saggio allorché il DNA genomico è stato sottoposto a sei cicli di congelamento/scongelo.
- 5 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.

- 1 **Alcuni componenti del saggio contengono composti 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. Maneggiare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni applicabili a livello regionale, nazionale e locale.** Per informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS alla pagina Web [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html). Per maggiori informazioni, vedere [Reagenti a pagina 7](#).
- 2 Alcuni componenti di questo saggio contengono 2-mercaptoetanololo, un agente riducente. Per maggiori informazioni, vedere [Reagenti a pagina 7](#). 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 informazioni, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.
- 3 Manipolare tutti i campioni come agenti potenzialmente infettivi.
- 4 Il mancato rispetto delle procedure descritte può produrre risultati errati o una riduzione significativa della qualità del campione.
- 5 Adottare le normali precauzioni di laboratorio. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere o fumare nelle zone 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.
- 6 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 di saggi sono identificati sull'etichetta della confezione del saggio.
- 7 Conservare i componenti del saggio alla temperatura indicata e in aree designate per la pre-amplificazione e la post-amplificazione.
- 8 Cicli ripetuti di congelamento-scongelo (fino a sei) dei componenti dalla scatola 1 non compromettono l'integrità del saggio.

- 9 Onde evitare il degrado del campione o del reagente, accertarsi che tutti i vapori di sodio ipoclorito si siano dissipati completamente prima di iniziare il protocollo.
- 10 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.
- 11 Al fine di prevenire la contaminazione, accertarsi che le zone di pre-amplificazione e di post-amplificazione siano dotate di apparecchiatura dedicata (ad es., pipette, punte di pipette, agitatori e centrifughe).
- 12 Evitare la contaminazione incrociata. Utilizzare punte di 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.
- 13 L'accoppiamento indice-campione deve corrispondere alle informazioni sul campione immesse per la corsa MiSeqDx. La mancata corrispondenza tra le informazioni sul campione e il layout della piastra risulterà in un'identificazione errata del campione e nel riportare risultati errati.
- 14 Per le fasi di lavaggio, preparare sempre al momento etanolo all'80%. L'etanolo può assorbire l'acqua dall'aria e influire sui risultati.
- 15 Assicurarsi che tutto l'etanolo venga rimosso dal fondo dei pozzetti durante le fasi di lavaggio. L'etanolo residuo può influire sui risultati.
- 16 Rispettare il tempo di asciugatura indicato dopo la fase del supporto magnetico al fine di garantire che l'evaporazione sia completa. L'etanolo residuo può influire sulle prestazioni delle reazioni successive.
- 17 Non mescolare il pool di oligonucleotidi per il saggio CF 139-Variant e il tampone di ibridazione per la conservazione. Usato in combinazione, il pool di oligonucleotidi per il saggio CF 139-Variant diventa instabile, anche se conservato congelato.
- 18 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.
- 19 Aggiungere sempre PCR polimerasi al Master Mix per PCR subito prima dell'uso. Non conservare mai la soluzione di lavoro combinata.
- 20 Durante la fase di normalizzazione della libreria, è estremamente importante risospendere completamente il pellet di microsferi della libreria. Questo è fondamentale per ottenere una densità cluster omogenea sulla cella a flusso MiSeqDx.
- 21 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.
- 22 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.
- 23 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.
- 24 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. Le varianti con una designazione No Call (Identificazione non riuscita) non devono essere riportate 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 11** Acronimi del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina

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

## Note sulle procedure

- 1 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 templatato). Il campione di DNA di controllo positivo deve essere un campione ben caratterizzato con una o più mutazioni 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.
- 2 Prima di iniziare il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant, estrarre e quantificare il DNA.
- 3 È possibile utilizzare qualsiasi metodo di estrazione del DNA convalidato.
- 4 Quantificare il DNA con uno spettrofotometro. Verificare che l'A260/A280 del campione di DNA sia maggiore di 1,5. Normalizzare il campione di DNA a 50 ng/μl. Per ciascun campione sono necessari 5 μl di DNA genomico (250 ng totali).

## Rendimento dei campioni e rappresentazione degli indici

Per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina, il rendimento dei campioni per corsa di MiSeqDx può essere tra 8 e 48 campioni. I primer di indicizzazione usati durante l'amplificazione mediante PCR devono essere scelti in base al rendimento dei campioni finale desiderato per garantire diversità nella sequenza d'indice.



### NOTA

Per la massima efficienza di rendimento, eseguire la preparazione delle librerie per un massimo di 96 campioni, quindi dividere i campioni in due corse di sequenziamento con un massimo di 48 campioni ciascuno. MiSeqDx può sequenziare solo 48 campioni alla volta. Per MiSeq Reporter, creare fogli campioni separati per ciascun set di 48 campioni. Per Local Run Manager, immettere le informazioni sui campioni per ciascun set di 48 campioni direttamente nel modulo di analisi CF 139 Variant.

MiSeqDx utilizza un LED verde per il sequenziamento delle basi G/T e un LED rosso per il sequenziamento delle basi A/C. Per garantire la corretta registrazione, a ogni ciclo deve essere letto almeno uno dei due nucleotidi per ogni canale cromatico. È importante conservare l'equilibrio cromatico per ciascuna base della lettura indici sequenziata, altrimenti potrebbe verificarsi un problema di registrazione durante il sequenziamento di Index Read (Lettura indici).

Per scegliere le combinazioni di primer indice per la preparazione delle librerie di campioni da 48 o 96 campioni, vedere la [Tabella 12](#).

**Tabella 12** Combinazioni primer indice per corse di sequenziamento a 48 campioni o 96 campioni

Primer indice 1 (I7) set 1 colonne 1-6	Primer indice 1 (I7) set 2 colonne 7-12	Primer indice 2 (I5) righe A-H
Primer indice 1 (A701)	Primer indice 6 (A706)	Primer indice A (A501)
Primer indice 2 (A702)	Primer indice 7 (A707)	Primer indice B (A502)
Primer indice 3 (A703)	Primer indice 8 (A708)	Primer indice C (A503)
Primer indice 4 (A704)	Primer indice 9 (A709)	Primer indice D (A504)
Primer indice 5 (A705)	Primer indice 11 (A711)	Primer indice E (A505)
Primer indice 10 (A710)	Primer indice 12 (A712)	Primer indice F (A506)
--	--	Primer indice G (A507)
--	--	Primer indice H (A508)

Se in una corsa di sequenziamento vengono sequenziati meno di 48 campioni, selezionare gli indici appropriati in base alle relative sequenze per conservare il bilanciamento cromatico nei canali verde e rosso (vedere la [Tabella 14](#) e la [Tabella 15](#)). Come requisito minimo, le corse da 8 a 48 campioni devono includere una combinazione di primer di indicizzazione identificata nella [Tabella 13](#).

Per elaborare in maniera accurata corse più piccole, devono essere presenti almeno otto campioni. Se non sono disponibili sei campioni univoci (esclusi i controlli positivi e negativi), è accettabile completare la corsa con replicati o qualsiasi campione di DNA genomico umano. Per il set minimo di indici bilanciati per colore da usare nelle corse di sequenziamento a 8 campioni, vedere la [Tabella 13](#).

**Tabella 13** Combinazioni primer indice per corse di sequenziamento a 8 campioni

	Primer indice 1 (A701)	Primer indice 2 (A702)	Primer indice 10 (A710)
Primer indice C (A503)	Campione 1	Campione 2	Campione 3
Primer indice D (A504)	Campione 4	Campione 5	Campione 6
Primer indice E (A505)	Campione 7	Campione 8	--



## Sequenze dei primer indice

Tabella 14 Primer indice 1 (I7) set 1 e set 2

Primer indice	Sequenziamento
Primer indice 1 (A701)	ATCACGAC
Primer indice 2 (A702)	ACAGTGGT
Primer indice 3 (A703)	CAGATCCA
Primer indice 4 (A704)	ACAAACGG
Primer indice 5 (A705)	ACCCAGCA
Primer indice 6 (A706)	AACCCCTC
Primer indice 7 (A707)	CCCAACCT
Primer indice 8 (A708)	CACCACAC
Primer indice 9 (A709)	GAAACCCA
Primer indice 10 (A710)	TGTGACCA
Primer indice 11 (A711)	AGGGTCAA
Primer indice 12 (A712)	AGGAGTGG

Tabella 15 Primer indice 2 (I5)

Primer indice	Sequenziamento
Primer indice A (A501)	TGAACCTT
Primer indice B (A502)	TGCTAAGT
Primer indice C (A503)	TGTTCTCT
Primer indice D (A504)	TAAGACAC
Primer indice E (A505)	CTAATCGA
Primer indice F (A506)	CTAGAACA
Primer indice G (A507)	TAAGTCC
Primer indice H (A508)	TAGACCTA

## Istruzioni per l'uso

## Immissione delle informazioni per la corsa

Per impostare una corsa con il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant sono disponibili due opzioni software: MiSeq Reporter o Local Run Manager.

Se si utilizza il software MiSeq Reporter, utilizzare Illumina Worklist Manager per generare un foglio campioni.

Se si utilizza il software Local Run Manager, non è disponibile un foglio campioni separato. Immettere le informazioni per la corsa e per i campioni direttamente nel modulo di analisi Local Run Manager CF 139 Variant.

Per maggiori informazioni sulle differenze tra MiSeq Reporter e Local Run Manager, vedere [Metodi per interfacciare lo strumento MiSeqDx a pagina 6](#).

## Utilizzo di Illumina Worklist Manager (IWM)

### Preparazione del foglio campioni MiSeqDx

- 1 Dalla schermata Welcome (Benvenuto) di Illumina Worklist Manager, selezionare **Create Worklist** (Crea lista di lavoro).
- 2 Nel campo Test Type (Tipo test), selezionare **CF 139-Variant Assay** (Saggio CF 139-Variant).
- 3 Nel campo Worklist Name (Nome lista di lavoro), immettere un nome per il foglio campioni.
  - Se per il nome del foglio campioni viene utilizzato l'ID alfanumerico del codice a barre della cartuccia di reagenti, MiSeq Operating Software (MOS) troverà automaticamente il foglio campioni.
  - Se per il foglio campioni viene utilizzato un qualsiasi altro nome, il pulsante **Browse** (Sfoglia) in MiSeq Operating Software (MOS) può essere utilizzato per trovare il foglio campioni corretto.
- 4 **[Facoltativo]** Immettere una descrizione per identificare la corsa.
- 5 Assicurarsi che la data corrisponda alla data di inizio della corsa.
- 6 Selezionare **Next** (Avanti).

### Inserimento delle informazioni sui campioni

- 1 Nella scheda Table (Tabella) o nella scheda Plate (Piastra), inserire le seguenti informazioni per ogni pozzetto contenente campione:
  - a **Sample ID** (ID campione): inserire un ID campione univoco.
  - b **Index 1 e Index 2** (Indice 1 e Indice 2): specificare l'adattatore indice che sarà utilizzato per ogni Index Read (Lettura indici).
- 2 **[Facoltativo]** Per registrare informazioni più dettagliate sui campioni, inserire il nome e la descrizione di un campione.
- 3 **[Facoltativo]** Per identificare i controlli sulla piastra, selezionare Negative (Negativo) o Positive (Positivo) dal menu a discesa **Control** (Controllo).
- 4 Andare alla scheda Plate Graphic (Schema piastra) e utilizzare l'opzione **Copy to Clipboard** (Copia in appunti) o **Print** (Stampa) per acquisire un'immagine della piastra campioni.
- 5 Selezionare **Finish** (Termina). Quando si salva il foglio campioni, il software crea un file .csv e un file .png di Plate Graphic (Schema piastra) automaticamente e li salva nella stessa posizione da utilizzare con l'impostazione dell'esperimento.



#### NOTA

Utilizzare Illumina Worklist Manager esclusivamente per modificare le informazioni del foglio campioni. Se le modifiche non vengono eseguite mediante Illumina Worklist Manager la corsa o l'analisi potrebbe non riuscire.

## Utilizzo del modulo di analisi Local Run Manager CF 139 Variant

### Impostazione dei parametri


- 1 Accedere a Local Run Manager.
- 2 Fare clic su **Create Run** (Crea corsa) e selezionare **CF 139**.
- 3 Immettere un nome che identifichi la corsa dal sequenziamento fino all'analisi.  
Utilizzare caratteri alfanumerici, spazi, trattini bassi o trattini.
- 4 **[Facoltativo]** Immettere una descrizione per identificare la corsa.  
Utilizzare caratteri alfanumerici.

## Impostazione dei campioni per la corsa


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

- **Immissione manuale dei campioni**
  - 1 Selezionare il numero di campioni dal menu a discesa Number of Samples (Numero di campioni). Prendere in considerazione le seguenti informazioni quando si effettua una selezione.
    - Scegliere il numero di campioni che più si avvicina al numero di campioni da analizzare. Se il numero esatto di campioni non è presente nell'elenco, selezionare il numero che più vi si avvicina, ma che sia inferiore al numero di campioni da analizzare, in questo modo vengono soddisfatti i requisiti per la diversità dell'indice. Ad esempio, se si desidera analizzare 18 campioni, selezionare 16 campioni. Quindi aggiungere due ulteriori campioni. Assicurarsi di selezionare gli adattatori indice per i pozzetti in più.
  - 2 Utilizzare la tabella vuota presente sulla 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.
- 2 Fare clic con il pulsante destro del mouse e selezionare i campioni di controllo positivi e negativi.
- 3 [Facoltativo] Immettere una descrizione del campione nel campo Sample Description (Descrizione del campione). Utilizzare caratteri alfanumerici, trattini, trattini bassi o spazi.
- 4 [Facoltativo] Selezionare un adattatore indice 1 dall'elenco a discesa Index 1 (i7) (Indice 1 - i7). Questa fase è facoltativa poiché le combinazioni indice i7 e i5 popolano automaticamente i pozzetti già evidenziati soddisfano i requisiti di diversità.
- 5 [Facoltativo] Selezionare un adattatore indice 2 dall'elenco a discesa Index 2 (i5) (Indice 2 - i5). Questa fase è facoltativa poiché le combinazioni indice i7 e i5 popolano automaticamente i pozzetti già evidenziati soddisfano i requisiti di diversità.
- 6 Fare clic sull'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] Fare clic su **Export** (Esporta) per esportare le informazioni sui campioni in un file esterno.
- 9 Fare clic su **Save Run** (Salva corsa).

## Importazione dei campioni

- 1 Fare clic su **Import Samples** (Importa campioni) e andare alla posizione in cui si trova il file contenente le informazioni sui campioni. Possono essere importati due tipi di file.
  - Fare clic su **Template** (Modello) per creare un nuovo layout della piastra. Il file modello contiene le intestazioni di colonna corrette per eseguire l'importazione. In ciascuna colonna, immettere le informazioni sui campioni da analizzare nella corsa. Eliminare le informazioni di esempio nelle caselle non utilizzate, quindi salvare il file.
  - Utilizzare un file, contenente le informazioni sui campioni, che era stato esportato dal modulo CF 139 Variant mediante la funzione Export (Esporta).
- 2 Fare clic sull'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 Fare clic su **Save Run** (Salva corsa).

## Ibridazione del raggruppamento in pool di oligonucleotidi

### Preparazione

- 1 Portare a temperatura ambiente il pool di oligonucleotidi per il saggio CF 139-Variant, il tampone di ibridazione, i campioni di DNA genomici e il campione di controllo positivo.
- 2 Inserire in un agitatore il pool di oligonucleotidi per il saggio CF 139-Variant e il tampone di ibridazione e agitare vigorosamente per assicurarsi che tutti i precipitati siano completamente disciolti, quindi centrifugare brevemente le provette per raccogliere il liquido.
- 3 Impostare un blocco termico per piastra a 96 pozzetti su 95 °C.
- 4 Preriscaldare un incubatore a 37 °C.
- 5 Creare la piastra campioni in base all'immagine stampata dello schema della piastra ottenuta da Illumina Worklist Manager o Local Run Manager.

### Procedura

- 1 Preparare una nuova piastra PCR a 96 pozzetti (di seguito chiamata piastra **HYB**).
- 2 Dispensare 5 µl di campione o campione di controllo a 50 ng/µl (250 ng totali) nei pozzetti appropriati nella piastra **HYB**. Seguire il layout della piastra generato per la corretta selezione dei pozzetti.
- 3 Dispensare 5 µl del pool di oligonucleotidi per il saggio CF 139-Variant in tutti i pozzetti contenenti il campione.
- 4 Dispensare 40 µl di tampone di ibridazione in ogni pozzetto contenente il campione sulla piastra **HYB**. Pipettare delicatamente su e giù 3-5 volte per miscelare.
- 5 Sigillare la piastra **HYB** e centrifugare 1.000 × g a 20 °C per un minuto.
- 6 Inserire la piastra **HYB** nel blocco preriscaldato a 95 °C e incubare per un minuto.
- 7 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).

Il raffreddamento graduale è essenziale per un'ibridazione corretta; pertanto, per questo processo non si consigliano termociclatori per PCR con raffreddamento attivo (ad es., Peltier, raffreddato termoelettricamente).



#### 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

### Preparazione

- 1 Portare la miscela di estensione-ligazione, il tampone di lavaggio stringente e il tampone di lavaggio universale a temperatura ambiente, quindi agitare brevemente.
- 2 Assemblare l'unità piastra filtro (di seguito chiamata **FPU**) nell'ordine dall'alto verso il basso: coperchio, piastra filtro, colletto adattatore e 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.



#### NOTA

Verificare che tutti i pozzetti della piastra filtro siano completamente drenati. Se il tampone di lavaggio non fa defluire tutto il liquido, 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 varianti di singolo nucleotide (Single Nucleotide Variant, 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 Trasferire tutto il volume di ciascun campione (circa  $55\text{ }\mu\text{l}$ ) 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  $45\text{ }\mu\text{l}$  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 Ripetere il lavaggio come descritto nella fase precedente.



#### NOTA

Se il tampone di lavaggio non fa defluire tutto il liquido, centrifugare di nuovo a  $2.400 \times g$  a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  finché tutto il liquido non viene espulso (ulteriori 5-10 minuti).

- 6 Smaltire tutto il materiale defluito (contenente formammide), quindi riassemblare la piastra **FPU**.
- 7 Dispensare  $45\text{ }\mu\text{l}$  di tampone di lavaggio universale in ogni pozzetto contenente il campione.
- 8 Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a  $2.400 \times g$  a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 10 minuti.



#### NOTA

Accertarsi che tutto il liquido sia defluito dopo la centrifugazione. Se necessario, ripetere la centrifugazione.

## Estensione-ligazione degli oligonucleotidi legati

### Procedura

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

## Amplificazione mediante PCR

### Preparazione

- 1 Preparare una nuova soluzione di NaOH 0,05 N.
- 2 Determinare i primer indice da utilizzare in base all'immagine stampata dello schema della piastra ottenuta da Illumina Worklist Manager o Local Run Manager.
- 3 Portare Master Mix per PCR e i primer indice appropriati a temperatura ambiente. Inserire in un agitatore ogni provetta scongelata per miscelare e quindi centrifugare brevemente le provette.
- 4 Preparare una nuova piastra PCR a 96 pozzetti (di seguito chiamata piastra **AMP**).
- 5 Aggiungere i primer indice alla piastra AMP nel modo seguente:
  - a Dispensare  $4\text{ }\mu\text{l}$  dei primer indice selezionati [A (A501) - H (A508)] nel pozzetto appropriato in una colonna della piastra **AMP**.
  - b Smaltire i tappi bianchi originali e applicare tappi bianchi nuovi.
  - c Dispensare  $4\text{ }\mu\text{l}$  dei primer indice selezionati [1 (A701) - 12 (A712)] nella riga appropriata della piastra **AMP**. *Le punte devono essere sostituite dopo ogni riga per evitare la contaminazione incrociata.*
  - d Smaltire i tappi arancioni originali e applicare tappi arancioni nuovi.
- 6 Preparare la soluzione di lavoro per la PCR con Master Mix per PCR/PCR polimerasi nel modo seguente:
  - a Prima dell'utilizzo, centrifugare brevemente la provetta contenente la PCR polimerasi per rimuovere le bolle d'aria.
  - b Per 96 campioni, aggiungere  $56\text{ }\mu\text{l}$  di PCR polimerasi a  $2,8\text{ ml}$  di Master Mix per PCR.
  - c Capovolgere 20 volte la soluzione di lavoro per la PCR preparata per miscelarla.

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

## Procedura

- 1 Rimuovere la piastra **FPU** dall'incubatore e rimuovere il sigillo in alluminio.
- 2 Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a  $2.400 \times g$  a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  per due minuti.
- 3 Dispensare  $25\ \mu\text{l}$  di  $0,05\ \text{N}$  di NaOH in ogni pozzetto contenente campione sulla piastra filtro. Pipettare NaOH su e giù 5-6 volte.
- 4 Coprire e incubare la piastra filtro a temperatura ambiente per cinque minuti.
- 5 Durante l'incubazione della piastra filtro, trasferire  $22\ \mu\text{l}$  della soluzione di lavoro per la PCR in ogni pozzetto della piastra AMP contenente i primer indice.
- 6 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  $20\ \mu\text{l}$  dalla piastra filtro alla colonna corrispondente della piastra **AMP**.
  - c Pipettare delicatamente su e giù 5-6 volte per miscelare accuratamente il DNA con la soluzione di lavoro per la PCR.
  - d Trasferire le colonne restanti dalla piastra filtro alla piastra AMP in modo simile. *Le punte devono essere sostituite dopo ogni colonna per evitare la contaminazione incrociata.*
- 7 Sigillare la piastra **AMP** e assicurarla con un rullo di gomma.
- 8 Centrifugare a  $1.000 \times g$  a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  per un minuto.
- 9 Trasferire la piastra **AMP** nell'area di post-amplificazione.
- 10 Eseguire la PCR utilizzando il seguente programma su un termociclatore:
  - $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 3 minuti
  - 25 cicli di:
    - $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 30 secondi
    - $62\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 30 secondi
    - $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 60 secondi
  - $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 5 minuti
  - Mantenere la temperatura a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$



### 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  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  per un massimo di 48 ore.

## Pulizia della PCR

### Preparazione

- 1 Portare le microsfere per la pulizia della PCR a temperatura ambiente.
- 2 Preparare al momento etanolo all'80% a partire dall'etanolo assoluto.

### Procedura

- 1 Centrifugare la piastra AMP a  $1.000 \times g$  a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  per un minuto.
- 2 Preparare una nuova piastra MIDI (di seguito chiamata piastra **CLP**).
- 3 Capovolgere 10 volte le microsfere per la pulizia della PCR. Agitare energicamente e quindi capovolgere altre 10 volte. Controllare visivamente la soluzione per assicurarsi che le microsfere siano risospese.
- 4 Dispensare  $45\ \mu\text{l}$  di microsfere per la pulizia della PCR in ogni pozzetto della piastra **CLP**.
- 5 Trasferire l'intero prodotto per la PCR dalla piastra AMP alla piastra **CLP**.
- 6 Sigillare la piastra **CLP** e agitare su uno shaker per micropiastre a  $1.800\ \text{rpm}$  per due minuti.
- 7 Incubare a temperatura ambiente senza agitare per 10 minuti.
- 8 Posizionare la piastra su un supporto magnetico per un minimo di due minuti o fino alla scomparsa del surnatante.
- 9 Lasciando la piastra **CLP** sul supporto magnetico, rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.

- 10 Lasciando la piastra **CLP** sul supporto magnetico, lavare le microsfere nel modo seguente:
  - a Dispensare 200 µl di etanolo all'80% preparato al momento in ogni pozzetto contenente il campione.
  - b Incubare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di 30 secondi o finché il surnatante è limpido.
  - c Rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.
- 11 Ripetere il lavaggio come descritto nella fase precedente.
- 12 Utilizzare una pipetta multicanale P20 impostata su 20 µl per rimuovere l'eccesso di etanolo.
- 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 pozzetto contenente il campione.
- 15 Sigillare la piastra **CLP** e agitare su uno shaker per micropiastre a 1.800 rpm 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 Posizionare la piastra **CLP** sul supporto magnetico per un minimo di due minuti o finché il surnatante è limpido.
- 18 Preparare una nuova piastra MIDI (di seguito chiamata piastra **LNP**).
- 19 Trasferire 20 µl di surnatante dalla piastra **CLP** alla piastra **LNP**.
- 20 **[Facoltativo]** Trasferire i restanti 10 µl di surnatante dalla piastra **CLP** su una nuova piastra ed etichettare la piastra con il nome della corsa e la data. Conservare questa piastra a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C fino al completamento della corsa di sequenziamento e 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  $1.000 \times g$  a 20 °C per un minuto. La piastra è stabile per un massimo di 3 ore a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

## Normalizzazione e raggruppamento in pool delle librerie

### Preparazione

- 1 Preparare 0,1 N di NaOH al momento aggiungendo 30 µl di 10 N di NaOH a 2.970 µl di acqua priva di RNasi/DNasi.
- 2 Portare a temperatura ambiente il diluente di normalizzazione della libreria, le microsfere della libreria, il lavaggio di normalizzazione della libreria e il tampone di diluizione della libreria.
- 3 Agitare il diluente di normalizzazione della libreria energicamente e assicurarsi che tutti i precipitati si siano disciolti.
- 4 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.

### Procedura

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



#### NOTA

Se si stanno analizzando meno di 24 campioni, utilizzare una provetta nuova da 1,5 ml.

- a Per 96 campioni, dispensare 4,4 ml di diluente di normalizzazione della libreria.
- b Pipettare le microsfere della libreria su e giù 10 volte per risospenderle.



#### NOTA

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

- c Per 96 campioni, pipettare 800 µl di microsfere della libreria nella provetta contenente il diluente di normalizzazione della libreria.
- d Miscelare capovolgendo la provetta 15-20 volte.

- 2 Dispensare 45 µl della soluzione di lavoro di diluente di normalizzazione della libreria/microsfere della libreria combinata in ogni pozzetto della piastra **LNP** contenente le librerie.
- 3 Sigillare la piastra **LNP** e agitare su uno shaker per micropiastre a 1.800 rpm per 30 minuti.

**NOTA**

Se lo stesso giorno si procede con il sequenziamento, questo è un buon momento per iniziare lo scongelamento della cartuccia di reagenti. Attenersi alle istruzioni relative allo scongelamento della cartuccia di reagenti MiSeqDx contenute nella sezione *Preparazione della cartuccia di reagenti* a pagina 25.

- 4 Posizionare la piastra su un supporto magnetico per un minimo di due minuti o fino alla scomparsa del surnatante.
- 5 Lasciando la piastra **LNP** sul supporto magnetico, rimuovere attentamente il surnatante e smaltirlo.
- 6 Rimuovere la piastra **LNP** dal supporto magnetico e lavare le microsfere con il lavaggio di normalizzazione della libreria nel modo seguente:
  - a Dispensare 45 µl di lavaggio di normalizzazione della libreria in ogni pozzetto contenente il campione.
  - b Sigillare la piastra **LNP** e agitare su uno shaker per micropiastre a 1.800 rpm per cinque minuti.
  - c Posizionare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di due minuti o finché il surnatante è limpido.
  - d Rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.
- 7 Ripetere la procedura del 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 rpm per cinque minuti.
- 11 Durante l'eluizione di cinque minuti, preparare una nuova piastra PCR a 96 pozzetti (di seguito chiamata piastra **SGP**).
- 12 Dispensare 30 µl di tampone di conservazione della libreria in ciascun pozzetto da utilizzare nella piastra **SGP**.
- 13 Dopo l'eluizione di cinque minuti, 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 per risospesare le microsfere, quindi agitare per altri cinque minuti.
- 14 Posizionare la piastra **LNP** sul supporto magnetico per un minimo di due minuti.
- 15 Trasferire il surnatante dalla piastra **LNP** alla piastra **SGP**. Pipettare delicatamente su e giù cinque volte per miscelare.
- 16 Sigillare la piastra **SGP** e centrifugare a  $1.000 \times g$  a 20 °C per un minuto.
- 17 Agitare il tampone di diluizione libreria e assicurarsi che tutti i precipitati si siano disciolti completamente.
- 18 Centrifugare brevemente per raccogliere i contenuti.
- 19 Predisporre una provetta Eppendorf nuova (d'ora in avanti indicata come provetta **PAL** [Pooled Amplicon Library - Libreria di ampliconi raggruppati in pool]).
- 20 Determinare i campioni da raggruppare in pool per il sequenziamento. Per il sequenziamento è possibile utilizzare al massimo 48 campioni contemporaneamente.
- 21 Trasferire 5 µl di ciascuna libreria da sequenziare dalla piastra **SGP**, colonna per colonna, a una striscia a otto provette per PCR.
- 22 Combinare e trasferire il contenuto della striscia a otto provette per PCR nella provetta **PAL**. Miscelare accuratamente la provetta **PAL**.
- 23 Predisporre una provetta Eppendorf nuova (d'ora in avanti indicata come provetta **DAL** [Diluted Amplicon Library - Libreria di ampliconi diluita]).
- 24 Dispensare 585 µl di tampone di diluizione libreria nelle provette **DAL**.
- 25 Trasferire 9 µl di **PAL** in ogni provetta **DAL** contenente il tampone di diluizione libreria. 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 14 giorni.

**Sequenziamento delle librerie****Preparazione per il sequenziamento delle librerie**

- 1 Predisporre un blocco termico adatto a centrifugare provette da 1,5 ml a 96 °C.
- 2 In un portaghiaccio, preparare un bagno d'acqua e ghiaccio. Raffreddare il tampone di diluizione libreria nel bagno d'acqua e ghiaccio.
- 3 Cominciare a scongelare la cartuccia di reagenti MiSeqDx.

**Preparazione della cartuccia di reagenti**

- 1 Scongelare la cartuccia di reagenti MiSeqDx per il saggio CF 139-Variant in un bagno d'acqua contenente acqua da laboratorio a temperatura ambiente per consentire di immergere la base della cartuccia di reagenti fino alla linea di livello acqua stampata sulla cartuccia stessa. Evitare che l'acqua superi la linea di massimo livello acqua.
- 2 Lasciare la cartuccia di reagenti a scongelare nel bagno d'acqua a temperatura ambiente per circa un'ora o fino a scongelamento.
- 3 Rimuovere la cartuccia dal bagno d'acqua e picchiettarla delicatamente sul banco per far fuoriuscire l'acqua in eccesso dalla base. Asciugare la base della cartuccia. Verificare che sulla parte superiore della cartuccia di reagenti non sia caduta dell'acqua.

**Ispezione della cartuccia di reagenti**

- 1 Capovolgere la cartuccia dieci volte per miscelare i reagenti scongelati, quindi ispezionare tutte le posizioni per accertarsi che siano scongelate.

**NOTA**

È fondamentale che i reagenti nella cartuccia siano scongelati completamente e miscelati per assicurare il sequenziamento corretto.

- 2 Ispezionare i reagenti nelle posizioni 1, 2 e 4 per accertarsi che siano ben miscelati e privi di precipitati.
- 3 Picchiettare delicatamente la cartuccia sul banco per ridurre le bolle d'aria nei reagenti.

**NOTA**

I tubi dei pescanti di MiSeqDx vanno fino al fondo di ciascun serbatoio per aspirare i reagenti, per questa ragione è importante che i serbatoi non contengano bolle d'aria.

- 4 Riporre la cartuccia in ghiaccio o conservarla a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C (fino a sei ore) finché non si è pronti a impostare la corsa. Per risultati ottimali, procedere direttamente caricando il campione e impostando la corsa.

**Denaturazione e diluizione del campione di controllo interno PhiX**

- 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.

**NOTA**

Se il campione di controllo PhiX viene preparato lo stesso giorno della normalizzazione della libreria, può essere utilizzata 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 a 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 ottenere 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 Agitare brevemente per miscelare la soluzione della libreria del campione di controllo interno PhiX da 1 nM.
- 6 Centrifugare il campione di controllo interno PhiX da 1 nM a 280 × g a 20 °C per un minuto.
- 7 Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente per denaturare la libreria del campione di controllo interno PhiX in filamenti singoli.
- 8 Combinare i seguenti volumi in una nuova provetta per microcentrifuga per ottenere una libreria del campione di controllo interno PhiX da 20 pM:
  - Denaturare la libreria del campione di controllo interno PhiX (2 µl)
  - Tampone di diluizione libreria pre-raffreddato (98 µl)

**NOTA**

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 Dispensare 6 µl di campione di controllo interno PhiX da 20 pM nella provetta **DAL**.
- 4 Pipettare su e giù per 3-5 volte per sciacquare la punta e assicurarsi che il trasferimento sia completo.
- 5 Miscelare la provetta **DAL** agitandola alla velocità più elevata.
- 6 Centrifugare la provetta **DAL** a 1.000 × g a 20 °C per un minuto.
- 7 Incubare la provetta **DAL** in un blocco termico a 96 °C per due minuti.
- 8 Dopo l'incubazione, capovolgere la provetta **DAL** 1-2 volte per mescolarla, quindi porla immediatamente in un bagno d'acqua e ghiaccio.
- 9 Tenere la provetta **DAL** nel bagno d'acqua e ghiaccio per cinque minuti.

**NOTA**

Eseguire immediatamente la fase di denaturazione mediante calore prima di caricare la provetta **DAL** sulla cartuccia di reagenti MiSeqDx per assicurare un caricamento sufficiente di templatato sulla cella a flusso MiSeqDx.

## Caricamento delle librerie di campioni sulla cartuccia

- 1 Utilizzare una punta di una pipetta pulita e vuota da 1 ml per forare il sigillo sopra il serbatoio contrassegnato con la dicitura **Load Samples** (Caricamento campioni).
- 2 Pipettare 600 µl di librerie di campioni **DAL** nel serbatoio contrassegnato con la dicitura **Load Samples** (Caricamento campioni). Evitare di toccare il sigillo in alluminio.
- 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 usando l'interfaccia MiSeq Operating Software (MOS).

## Interpretazione dei risultati

- 1 Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina è progettato per rilevare le 139 varianti del gene CFTR, incluse quelle raccomandate dall'ACMG (Tabella 2).
- 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 raccomandata dall'ACMG; nel report del saggio sono elencati 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 MiSeqDx 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).
- 3 Il report del saggio fornisce informazioni sulla percentuale di identificazioni dei campioni per ciascun campione. La percentuale di identificazioni 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.
  - 4 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. Non verranno visualizzate informazioni sulla variante. Questo campione deve essere ripetuto.
  - 5 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.
  - 6 Se per un campione vengono identificate più di due varianti, si raccomanda di verificare il risultato ripetendo il campione usando il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina 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.

- 7 Tutte le interpretazioni delle varianti devono essere eseguite da un genetista molecolare certificato o equivalente attenendosi alle procedure e linee guida locali<sup>15</sup>. I possibili riferimenti per l'interpretazione includono, ma non sono limitati a: database CFTR<sup>21</sup>, classificazione di Sosnay<sup>13</sup>, linee guida 2004 dell'ACMG<sup>1</sup> e opinione 2011 della commissione ACOG<sup>2</sup>. 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 MiSeq Reporter, vedere la *Guida di consultazione del software MiSeq Reporter (documento n. 15038356)*. 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 Local Run Manager CF 139 Variant (documento n. 100000012184)*.

## 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 e nelle procedure tecniche nel laboratorio dell'utente che potrebbero produrre una variabilità significativa nei risultati.

- 1 **Controlli positivi:** un campione di DNA di controllo positivo è richiesto su ciascuna corsa. Il campione di DNA di controllo positivo deve essere un campione ben caratterizzato con almeno una variante nota del gene CFTR<sup>16</sup>. Illumina raccomanda di usare i controlli positivi in rotazione coerenti con le linee guida e gli standard tecnici 2008 dell'ACMG per l'analisi delle mutazioni della fibrosi cistica<sup>17</sup> e gli standard di laboratorio 2013 dell'ACMG per il sequenziamento di nuova generazione<sup>18</sup>. 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.
- 2 **Controllo negativo (nessun template/nessun DNA):** l'uso di un controllo negativo (nessun template/nessun DNA) è richiesto su ogni corsa per rilevare possibili incidenze di contaminazione. La percentuale di identificazioni per il controllo negativo deve essere di almeno il 10%. Se un controllo negativo genera una percentuale di identificazioni inferiore al 10%, potrebbe quindi 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.

**NOTA**

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%. Inoltre, proprio come con i campioni, quando la percentuale di identificazione è inferiore al 50%, nel report viene indicato un commento "Sample Failed" (Campione non riuscito).

- 3 **Controllo wild type:** il campione di DNA di controllo wild type è raccomandato in ogni corsa. 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.
- 4 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.
- 5 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

### Accuratezza

L'accuratezza del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina 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 consisteva di campioni clinici di gDNA archiviati, anonimizzati e 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 di duplex PCR ha utilizzato due gruppi di primer per discriminare tra genotipi wild type, eterozigote e omozigote. Uno dei gruppi di primer è stato progettato per affiancare i punti di rottura 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 (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 identificata 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 MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina 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 16 Accuratezza complessiva del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant

Variante (nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identifica- zioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazio- ni negative (wild type)	N. di manca- te identificazioni	N. di identificazio- ni non riuscite	Concor- danza positiva (%)	Concor- danza negativa (%)	Concor- danza complessiva (%)
				Campio- ni clinici	Campio- ni linee cellulari	Campio- ni 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

Variante (nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identifica- zioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazio- ni negative (wild type)	N. di manca- te identificazioni	N. di identificazio- ni non riuscite	Concor- danza positiva (%)	Concor- danza negativa (%)	Concor- danza complessiva (%)
				Campio- ni clinici	Campio- ni linee cellulari	Campio- ni sintetici						
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
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

Variante (nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identifica- zioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazio- ni negative (wild type)	N. di manca- te identificazioni	N. di identificazio- ni non riuscite	Concor- danza positiva (%)	Concor- danza negativa (%)	Concor- danza complessiva (%)
				Campio- ni clinici	Campio- ni linee cellulari	Campio- ni sintetici						
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	Identifica- zioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazio- ni negative (wild type)	N. di manca- te identificazioni	N. di identificazio- ni non riuscite	Concor- danza positiva (%)	Concor- danza negativa (%)	Concor- danza complessiva (%)
				Campio- ni clinici	Campio- ni linee cellulari	Campio- ni sintetici						
2143delT	DIV	c.2012delT	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100
2183AA>G	DIV	c.2051_ 2052del AAinsG	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
2184insA	DIV	c.2052_2 053insA	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_21 76insA	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

Variante (nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identifica- zioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazio- ni negative (wild type)	N. di manca- te identificazioni	N. di identificazio- ni non riuscite	Concor- danza positiva (%)	Concor- danza negativa (%)	Concor- danza complessiva (%)
				Campio- ni clinici	Campio- ni linee cellulari	Campio- ni sintetici						
3272-26A>G	SNV	c.3140-2 6A>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
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

Variante (nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identifica- zioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazio- ni negative (wild type)	N. di manca- te identificazioni	N. di identificazio- ni non riuscite	Concor- danza positiva (%)	Concor- danza negativa (%)	Concor- danza complessiva (%)
				Campio- ni clinici	Campio- ni linee cellulari	Campio- ni sintetici						
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 <sup>§</sup>	DEL	c.3964-78_ 4242+577del	500	1	0	1	498	1 <sup>§</sup>	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	Identifica- zioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazio- ni negative (wild type)	N. di manca- te identificazioni	N. di identificazio- ni non riuscite	Concor- danza positiva (%)	Concor- danza negativa (%)	Concor- danza complessiva (%)
				Campio- ni clinici	Campio- ni linee cellulari	Campio- ni 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
1525-1 G>A	SNV	c.1393-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variante (nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identifica- zioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazio- ni negative (wild type)	N. di manca- te identificazioni	N. di identificazio- ni non riuscite	Concor- danza positiva (%)	Concor- danza negativa (%)	Concor- danza complessiva (%)
				Campio- ni clinici	Campio- ni linee cellulari	Campio- ni sintetici						
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
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

Variante (nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identifica- zioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazio- ni negative (wild type)	N. di manca- te identificazioni	N. di identificazio- ni non riuscite	Concor- danza positiva (%)	Concor- danza negativa (%)	Concor- danza complessiva (%)
				Campio- ni clinici	Campio- ni linee cellulari	Campio- ni sintetici						
E822X	SNV	c.2464G>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2622+1 G>A <sup>¶</sup>	SNV	c.2490+1G>T <sup>¶</sup>	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
3121-1 G>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 <sup>^</sup>	SNV	c.3230T>C	500	0	0	1	499	0 <sup>^</sup>	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	Identifica- zioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazio- ni negative (wild type)	N. di manca- te identificazioni	N. di identificazio- ni non riuscite	Concor- danza positiva (%)	Concor- danza negativa (%)	Concor- danza complessiva (%)
				Campio- ni clinici	Campio- ni linee cellulari	Campio- ni 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_3 885insT	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 GTinsAA	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 <sup>ε</sup>	PolyTGPolyT	c.1210-12T[5_9]	19	17	2	0	0	0	0	100	N/A	100
I506V <sup>§</sup>	SNV	c.1516A>G	1	0	0	0	1	0	0	N/A	100	100
I507V <sup>§</sup>	SNV	c.1519A>G	1	0	0	0	1	0	0	N/A	100	100
F508C <sup>§</sup>	SNV	c.1523T>G	1	0	0	0	1	0	0	N/A	100	100
<b>Totale</b>			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 correttamente. MiSeqDx ha riportato la variante come omozigote.

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

<sup>^</sup> 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.

<sup>€</sup> Quando R117H è positivo, la variante PolyTG/PolyT viene ulteriormente riportata.

<sup>¥</sup> 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.

<sup>‡</sup> 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 17** Accuratezza del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant 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 18** Accuratezza del saggio MiSeqDx 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



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)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
(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
<b>Totale**</b>		<b>448</b>		<b>4</b>	<b>3</b>	<b>98,44</b>

\* 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 riportano 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 sistema per fibrosi cistica MiSeqDx è stata determinata mediante uno studio condotto in cieco in tre siti di sperimentazione con due operatori per ciascun sito. Due pannelli ben caratterizzati di 46 campioni ciascuno sono stati testati da ciascun operatore in ciascun sito per un totale di 810 identificazioni per sito. 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 19 Riproducibilità del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant

Pannello	Campione #	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per sito	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 (%)
					Sito 1	Sito 2	Sito 3	Sito 1	Sito 2	Sito 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

Pannello	Campione #	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per sito	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 complessi-va (%)
					Sito 1	Sito 2	Sito 3	Sito 1	Sito 2	Sito 3					
A	10**	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
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

Pannello	Campione #	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per sito	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 complessi-va (%)
					Sito 1	Sito 2	Sito 3	Sito 1	Sito 2	Sito 3					
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
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/A	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/A	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/A	100	100

Pannello	Campione #	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per sito	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 complessi-va (%)
					Sito 1	Sito 2	Sito 3	Sito 1	Sito 2	Sito 3					
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
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/A	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Pannello	Campione #	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per sito	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 complessi-va (%)
					Sito 1	Sito 2	Sito 3	Sito 1	Sito 2	Sito 3					
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	394deITT (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/A	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	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/A	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/A	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/A	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078deIT (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	Campione #	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per sito	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 complessi-va (%)
					Sito 1	Sito 2	Sito 3	Sito 1	Sito 2	Sito 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/A	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 <sup>§</sup>	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 <sup>§</sup>	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 <sup>^</sup>	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 <sup>^</sup>	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/A	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

Pannello	Campione #	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per sito	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 complessi-va (%)
					Sito 1	Sito 2	Sito 3	Sito 1	Sito 2	Sito 3					
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 <sup>§</sup>	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 <sup>§</sup>	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/A	100	100
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 20 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

Variazione (nome comune)	Tipo di variante	Regione del gene CFTR
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
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, estrazione mediante microsfere 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 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 microsfere 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 MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina è stato valutato eseguendo uno studio di diluizione in serie usando 14 campioni di DNA rappresentativi che contenevano 16 varianti uniche del gene della fibrosi cistica. Ciascun campione è stato analizzato in duplicati a 9 livelli di input di DNA che andavano da 1250 ng a 1 ng (1250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng e 1 ng). Per la determinazione dell'accuratezza, i genotipi dei campioni sono stati confrontati con i dati del sequenziamento bidirezionale Sanger, mentre le delezioni sono state confrontate con un saggio della PCR. 1250 ng e 25 ng sono stati identificati come il legame superiore e inferiore per l'input di DNA rispettivamente in quanto hanno ottenuto una percentuale di campioni di primo passaggio (first pass) del  $\geq 95\%$  senza identificazioni errate (100% di accuratezza e percentuale di identificazione).

Gli input di DNA di 1250 ng, 250 ng e 100 ng sono stati ulteriormente analizzati con 4 campioni di DNA rappresentativi e 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 MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina può essere usato nell'intervallo di input di DNA da 1250 ng a 25 ng.

## Sostanze interferenti

Per valutare l'impatto delle sostanze interferenti sul sistema per fibrosi cistica MiSeqDx Illumina, le prestazioni del saggio sono state valutate in presenza e in assenza di potenziali sostanze interferenti. Nello studio sono stati testati otto campioni di sangue intero inclusi tre campioni positivi CF 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; il tampone di lavaggio finale ottenuto mediante un metodo di isolamento su colonna di gel di silice è stato aggiunto al DNA genomico purificato.

Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina 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 dei primer indice in multiplex, è stato eseguito uno studio di contaminazione incrociata usando due campioni, ciascuno campione con genotipi omozigoti univoci a quattro diverse posizioni genomiche e due rispettivi primer indice. 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 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 µmol/l	137 µmol/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 del campione

I primer indici 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 unico 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 duplex PCR. Riproducibilità e accuratezza sono risultate del 100% per tutte le combinazioni di primer indice/campione.

### 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, Sternan 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, Sternan 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](http://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](http://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](http://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](http://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](http://www.nacconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf). [Online] Presentato da Garry 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, U.S.A..
- 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 ad essa affiliate ("Illumina") e sono destinati esclusivamente ad 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 a terzi alcuna licenza ai sensi dei suoi brevetti, marchi, copyright, o diritti riconosciuti dal diritto consuetudinario, né diritti similari di alcun genere.

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 PUÒ CAUSARE DANNI AL PRODOTTO, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI.

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

© 2020 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

Illumina, MiSeqDx, la tonalità di arancione e la grafica del fluire delle basi sono marchi di fabbrica di Illumina, Inc. e/o delle sue affiliate negli Stati Uniti e/o in altri paesi. Tutti gli altri nomi, loghi e altri marchi di fabbrica sono di proprietà dei rispettivi titolari.

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](http://www.illumina.com)



Illumina Netherlands B. V.  
Freddy van Riemsdijkweg 15  
5657 EE Eindhoven  
Paesi Bassi

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

## Etichettatura del prodotto

I riferimenti completi ai simboli che si trovano sulla confezione del prodotto e sull'etichettatura sono disponibili alla pagina Web [support.illumina.com](http://support.illumina.com) nella scheda *Documentation and Literature* (Documentazione e letteratura) per il kit in uso.