







































































































































13	2	200796749	87	Inserzione di 5 bp	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	Inserzione di 12 bp	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	Inserzione di 2 bp	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	Delezione di 23 bp	TAACTTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	Inserzione di 9 bp	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	Delezione di 1 bp	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	Delezione di 8 bp	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	Inserzione di 11 bp	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	Delezione di 4 bp	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	Inserzione di 8 bp	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	Delezione di 21 bp	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	Delezione di 3 bp	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	Delezione di 25 bp	CTTTCAC TTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	Delezione di 23 bp	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100

44	7	66276142	88	Inserzione di 1 bp	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	Delezione di 4 bp	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	Inserzione di 1 bp	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	Delezione di 4 bp	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	Delezione di 11 bp	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	Delezione di 1 bp	AG>A	15	15	0	0	N/A
53	8	76518677	67	Inserzione di 4 bp	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	Inserzione di 4 bp	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	Delezione di 21 bp	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	Delezione di 3 bp	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	Delezione di 16 bp	AGCGTCTATAACCAAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	Delezione di 2 bp	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	Inserzione di 2 bp	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	Inserzione di 8 bp	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100

75	11	118406328	85	Delezione di 8 bp	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	Delezione di 2 bp	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	Inserzione di 21 bp	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	Inserzione di 19 bp	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	Inserzione di 4 bp	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	Delezione di 20 bp	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	Delezione di 22 bp	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	Inserzione di 4 bp	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	Delezione di 16 bp	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	Delezione di 5 bp	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	Delezione di 6 bp	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	Delezione di 25 bp	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	Inserzione di 3 bp	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	Inserzione di 4 bp	G>GCTAC	9	0	0	9	100

105	16	85706416	91	Delezione di 7 bp	ATTATTTC>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	Delezione di 1 bp	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	Inserzione di 18 bp	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	Inserzione di 4 bp	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	84	Inserzione di 1 bp	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	Inserzione di 24 bp	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	Delezione di 4 bp	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	Delezione di 12 bp	TTTGTATCTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	Inserzione di 22 bp	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	Inserzione di 3 bp	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	Delezione di 2 bp	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	Delezione di 15 bp	TACTTGAGAACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	Inserzione di 5 bp	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	Inserzione di 11 bp	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100



134	20	62690925	87	Delezione di 16 bp	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30300873	66	Inserzione di 11 bp	G>GATAAAACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	Delezione di 21 bp	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	Delezione di 5 bp	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	Inserzione di 6 bp	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	Inserzione di 5 bp	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	Delezione di 10 bp	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

## Studio 2

In questo studio sono stati utilizzati campioni di tessuto di cancro del colon-retto in FFPE, presenti nelle banche dati, e un saggio rappresentativo di due geni confrontati con il metodo di riferimento, il sequenziamento bidirezionale Sanger (Sanger). Dei 1.183 soggetti, 441 soggetti hanno fornito risultati validi dal sequenziamento Sanger e dal saggio rappresentativo. Quando valutati a livello di soggetto (Tabella 15), 230 dei 441 soggetti erano positivi con il sequenziamento Sanger (mutazione rilevata da Sanger); di questi, 227 erano positivi con il saggio rappresentativo. I restanti 211 di 441 soggetti erano negativi con il sequenziamento Sanger (nessuna mutazione rilevata da Sanger); di questi, 206 erano negativi con il saggio rappresentativo. Questo ha fornito una concordanza positiva espressa in percentuale (PPA) di 98,7% e una concordanza negativa espressa in percentuale (NPA) di 97,6% (Tabella 15).

**Tabella 15** Concordeza positiva e negativa espressa in percentuale dei risultati a livello di soggetto

Saggio rappresentativo	Sequenziamento Sanger		Totale
	Positiva	Negativa	
Positiva	227 <sup>1</sup>	5	232
Negativa	3 <sup>2</sup>	206	209
Totale	230	211	441

#### Riepilogo delle prestazioni

Statistica concordanza	Punto stimato	IC esatto 95%
PPA	227/230 = 98,7%	[96,2%,99,7%]
NPA	206/211 = 97,6%	[94,6%,99,2%]

<sup>1</sup> Erano presenti 224 corrispondenze esatte tra i soggetti; per due soggetti, MiSeqDx ha rilevato la mutazione rilevata da Sanger e una ulteriore mutazione; per un soggetto, MiSeqDx e Sanger hanno rilevato mutazioni diverse.

<sup>2</sup> Un soggetto presentava due mutazioni rilevate dal sequenziamento Sanger; due soggetti presentavano una mutazione rilevata dal sequenziamento Sanger.

### Studio 3

Questo studio ha valutato le librerie di DNA preparate con campioni in FFPE su diversi tipi di campioni. Sono stati analizzati un totale di 109 campioni in FFPE da otto tipi diversi di tessuto (colon, ovaio, pancreas, surrenale, vescica, fegato, tiroide e seno) con almeno 11 campioni in FFPE che rappresentavano ciascun tipo di tessuto. Il tessuto surrenale includeva metastasi da tumore all'esofago, ai polmoni e al colon; gli altri tessuti presentavano tumori primari. Questo studio ha utilizzato un saggio rappresentativo progettato per interrogare 26 geni che coprono 21.577 basi su 17 cromosomi diversi. È stato sequenziato un totale di sei geni diversi (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* e *BRAF*) con il metodo Sanger dove ciascun tessuto di tumore presentava 1-3 geni sequenziati dal metodo Sanger in base alla prevalenza prevista delle mutazioni somatiche di quel tumore. I risultati del sequenziamento Sanger hanno identificato 39 mutazioni somatiche SNV in 33 dei 109 campioni in FFPE. MiSeqDx ha identificato 36 mutazioni somatiche SNV in 32 dei 109 campioni in FFPE con un falso negativo e due posizioni della variante con identificazioni non riuscite. La PPA era del 97,3%. MiSeqDx ha identificato 78.975 basi di riferimento su 109 campioni in FFPE con 29 falsi positivi relativi al sequenziamento Sanger e 2.437 identificazioni non riuscite. La NPA era del 99,9%. Una delezione di due basi era concordante tra i due metodi. La Tabella 16 riepiloga i risultati in base al tipo di tessuto.

**Tabella 16** Concordeza positiva e negativa espressa in percentuale in base al tipo di tessuto

Tipo di tessuto	N. di campioni	N. totale di varianti	N. totale di varianti TP	N. totale di varianti FN	N. totale di identificazioni TN	N. totale di identificazioni FP	N. totale di identificazioni non riuscite	PPA	NPA
Surrenale	16	6	4	1	11.823	2	607	80	> 99,9
Vescica	12	4	4	0	7.070	3	273	100	> 99,9
Seno	16	3	3	0	13.439	7	479	100	99,9
Colon	11	6	5	0	8.720	2	133	100	> 99,9
Fegato	13	3	3	0	7.984	1	59	100	> 99,9
Ovaio	13	7	7	0	10581	1	724	100	> 99,99
Pancreas	17	7	7	0	11.929	12	489	100	99,9
Tiroide	11	3	3	0	7.429	1	652	100	> 99,9
Totale	109	39	36	1	78.974	29	3.416	97,3	> 99,9

### Riproducibilità

Sono stati condotti due studi per valutare la riproducibilità dello strumento MiSeqDx con DNA estratto da campioni in FFPE. Lo Studio 1 ha utilizzato più strumenti; lo Studio 2 è stato svolto in più siti.

#### Studio 1

La riproducibilità dello strumento MiSeqDx è stata determinata utilizzando due strumenti e due operatori formati per un totale di otto corse. Il saggio rappresentativo, il contesto genomico dell'amplicone, i campioni e il metodo di riferimento sono gli stessi di quelli sopra descritti per lo Studio 1 di accuratezza. I risultati sono illustrati in base al singolo amplicone per ciascuno strumento (Tabella 17) per dimostrare la riproducibilità delle identificazioni sugli strumenti. La percentuale delle identificazioni corrette includeva le identificazioni errate e le identificazioni non riuscite (le identificazioni delle varianti non hanno soddisfatto uno o più filtri). Gli strumenti hanno generato numeri simili di identificazioni non riuscite dovute al determinato amplicone. Per lo strumento MiSeqDx 1 è stata osservata una sola identificazione errata entro una regione affidabile, in base alla definizione dello standard di riferimento Platinum Genomes. L'identificazione errata era un'identificazione falso positiva di una variante dell'inserzione nell'amplicone 64 che interrogava il cromosoma 10 nelle posizioni da 55892599 a 55892687; l'amplicone presentava un ripetizione del dinucleotide di 11.

**Tabella 17** Risultati di riproducibilità da strumento a strumento per lo strumento MiSeqDx (a livello dell'amplicone)

Amplicone	Cromosoma	Dimensione del frammento analizzato	Basi nella regione affidabile	Contenuto genomico dell'amplicone	Contenuto in GC	M70215			M70217		
						Totale di identificazioni corrette	Totale di identificazioni errate	N. totale di identificazioni non riuscite	Totale di identificazioni corrette	Totale di identificazioni errate	N. totale di identificazioni non riuscite
1	1	93	93	Indel	0,22	5.580	0	0	5.580	0	0
2	1	79	79	PolyA (5), PolyC (5), Indel	0,38	4.740	0	0	4.740	0	0
3	1	91	91	Indel	0,4	5.448	0	12	5.453	0	8
4	1	92	92	Indel	0,49	5.518	0	2	5.518	0	2
5	1	81	81	PolyG (5)	0,69	4.858	0	2	4.860	0	0
6	1	70	70	PolyT (10), Indel	0,39	4.200	0	0	4.200	0	0
7	1	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), Indel	0,27	5.279	0	1	5.279	0	1
8	2	90	90	Indel	0,28	5.400	0	0	5.400	0	0
9	2	80	80	Indel	0,38	4.800	0	0	4.800	0	0
10	2	85	81	N/A	0,65	4.859	0	1	4.859	0	1
11	2	75	75	PolyA (8)	0,35	4.468	0	40	4.468	0	40
12	2	88	88	PolyT (5)	0,42	5.280	0	0	5.280	0	0
13	2	87	87	PolyT (5), Indel	0,31	5.211	0	43	5.214	0	40
14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), Indel	0,3	5.453	0	7	5.449	0	11
15	2	93	93	N/A	0,43	5.579	0	1	5.579	0	1

16	2	73	73	PolyT (5), Indel	0,42	4.378	0	2	4.379	0	1
17	3	93	93	AT(3), Indel	0,27	5.396	0	184	5.396	0	184
18	3	83	83	N/A	0,43	4.980	0	0	4.980	0	0
19	3	70	70	CT(3), Indel	0,49	4.193	0	7	4.194	0	6
20	3	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	5.220	0	120	5.220	0	120
21	3	75	74	Indel	0,57	4.432	0	8	4.432	0	8
22	4	78	78	PolyA (6)	0,26	4.676	0	4	4.676	0	4
23	4	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	5.820	0	0	5.820	0	0
24	4	78	78	N/A	0,29	4.679	0	1	4.677	0	3
25	4	66	62	PolyA (5), Indel	0,36	3.720	0	0	3.720	0	0
26	4	71	69	PolyA (5)	0,46	4.140	0	0	4.140	0	0
27	4	62	62	PolyA (7), Indel	0,27	3.676	0	45	3.671	0	51
28	5	78	75	N/A	0,78	3.368	0	1.132	3.485	0	1.015
29	5	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	5.040	0	0	5.040	0	0
30	5	64	64	N/A	0,39	3.840	0	0	3.840	0	0
31	5	83	83	PolyA (6), Indel	0,3	4.979	0	1	4.980	0	0
32	5	67	67	PolyT (5)	0,37	4.020	0	0	4.020	0	0
33	5	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	5.460	0	0	5.460	0	0

34	5	75	75	Indel	0,43	4.498	0	6	4.500	0	1
35	6	102	102	PolyG (6)	0,68	6.120	0	0	6.120	0	0
36	6	92	92	Indel	0,63	5.520	0	0	5.520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), Indel	0,61	5.532	0	108	5.532	0	108
38	6	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	5.820	0	60	5.820	0	60
39	6	95	95	Indel	0,53	5.697	0	3	5.698	0	2
40	6	86	86	PolyC (6)	0,7	5.159	0	1	5.160	0	0
41	6	95	94	PolyG (5), Indel	0,61	5.638	0	2	5.638	0	2
42	6	91	91	PolyA (5)	0,44	5.460	0	0	5.460	0	0
43	7	73	73	N/A	0,44	4.380	0	0	4.380	0	0
44	7	88	88	Indel	0,35	5.279	0	1	5.276	0	4
45	7	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	5.184	0	36	5.181	0	39
46	7	85	85	Indel	0,38	5.100	0	0	5.100	0	0
47	7	90	90	PolyG (5), Indel	0,62	5.398	0	2	5.399	0	1
48	7	91	91	PolyG (6), PolyC (6), Indel	0,71	5.460	0	0	5.459	0	1
49	7	81	66	N/A	0,31	3.960	0	0	3.960	0	0
50	7	93	93	Indel	0,35	5.580	0	0	5.579	0	1
51	8	83	83	N/A	0,42	4.980	0	0	4.980	0	0

52	8	90	89	PolyG (7), CTC(4), Indel	0,61	5.219	0	121	5.220	0	120
53	8	67	67	Indel	0,3	4.020	0	0	4.020	0	0
54	9	98	98	PolyG (6)	0,67	5.879	0	1	5.880	0	0
55	9	65	65	Indel	0,32	3.894	0	6	3.895	0	5
56	9	96	96	N/A	0,49	5.760	0	0	5.760	0	0
57	9	83	83	AT(3)	0,37	4.973	0	7	4.978	0	2
58	9	97	97	PolyC (6), Indel	0,68	5.817	0	3	5.818	0	2
59	10	79	78	PolyG (5), Indel	0,47	4.679	0	1	4.680	0	0
60	10	98	91	GC(3)	0,87	450	0	5.010	632	0	4.828
61	10	79	79	PolyT (5)	0,3	4.740	0	0	4.740	0	0
62	10	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	5.400	0	0	5.400	0	0
63	10	95	95	Indel	0,35	5.699	0	1	5.699	0	1
64	10	89	88	AC(11), Indel	0,42	5.157	0	276	5.153	2	273
65	10	80	80	N/A	0,49	4.800	0	0	4.800	0	0
66	10	81	81	N/A	0,51	4.860	0	0	4.860	0	0
67	11	97	96	N/A	0,45	5.760	0	0	5.760	0	0
68	11	70	70	Indel	0,46	4.199	0	2	4.200	0	1
69	11	100	100	N/A	0,65	5.999	0	1	5.998	0	2
70	11	62	62	Indel	0,37	3.720	0	0	3.720	0	0
71	11	102	102	N/A	0,59	6.120	0	0	6.118	0	2

72	11	73	73	PolyA (5)	0,4	4.380	0	0	4.380	0	0
73	11	85	85	N/A	0,42	5.100	0	0	5.100	0	0
74	11	91	91	PolyG (6)	0,55	5.437	0	23	5.441	0	19
75	11	85	85	Indel	0,53	5.100	0	0	5.100	0	0
76	11	85	85	Poly A (5), CA(3), Indel	0,34	5.100	0	0	5.100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5.100	0	0	5.100	0	0
78	12	84	84	PolyC (5), Indel	0,52	5.040	0	60	5.038	0	63
79	12	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	5.577	0	3	5.573	0	7
80	12	81	81		0,49	4.860	0	0	4.860	0	0
81	12	71	71	PolyA (6)	0,35	4.260	0	0	4.260	0	0
82	12	95	95	PolyG (5)	0,68	5.605	0	95	5.605	0	95
83	13	73	73	N/A	0,52	4.380	0	0	4.379	0	1
84	13	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), Indel	0,22	5.220	0	60	5.220	0	60
85	13	89	89	Indel	0,49	5.340	0	0	5.340	0	0
86	13	77	77	Indel	0,39	4.620	0	0	4.620	0	0
87	14	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	4.020	0	0	4.020	0	0
88	14	83	83	N/A	0,25	4.980	0	0	4.980	0	0
89	14	73	72	PolyT (5), Indel	0,19	4.173	0	147	4.173	0	147



90	14	81	81	Indel	0,38	4.860	0	2	4.860	0	0
91	14	91	91	Indel	0,35	5.459	0	1	5.460	0	0
92	14	66	66	PolyA (5)	0,41	3.900	0	240	3.900	0	240
93	14	94	94	Indel	0,62	5.637	0	3	5.637	0	3
94	15	98	96	PolyC (5)	0,45	5.760	0	0	5.760	0	0
95	15	68	68	Indel	0,25	4.079	0	1	4.078	0	2
96	15	95	93	PolyG (5), Indel	0,68	5.475	0	105	5.487	0	93
97	15	95	95	PolyT (6)	0,43	5.699	0	1	5.700	0	0
98	15	72	71	Indel	0,65	4.260	0	0	4.260	0	0
99	15	91	91	N/A	0,36	5.460	0	0	5.460	0	0
100	15	70	70	Indel	0,56	4.200	0	0	4.200	0	0
101	16	63	63	N/A	0,27	3.780	0	0	3.780	0	0
102	16	95	95	PolyC (5)	0,67	5.700	0	0	5.700	0	0
103	16	87	87	TA(3)	0,41	5.220	0	0	5.220	0	0
104	16	104	104	PolyC (5)	0,67	6.238	0	3	6.238	0	3
105	16	91	91	PolyT (5), Indel	0,37	5.443	0	17	5.444	0	16
106	17	89	89	GC(3)	0,64	5.251	0	89	5.339	0	1
107	17	87	87	PolyC (5), Indel	0,67	5.212	0	8	5.212	0	8
108	17	91	91	Indel	0,46	5.459	0	1	5.459	0	1
109	17	93	93	Indel	0,26	5.580	0	0	5.580	0	0

110	17	91	89	PolyT (5)	0,54	5.340	0	0	5.340	0	0
111	17	84	82	Poly A (13), Indel (x2)	0,29	4.860	0	308	4.860	0	307
112	17	91	91	PolyA (5)	0,34	5.459	0	1	5.459	0	1
113	17	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), Indel	0,26	5.460	0	60	5.460	0	60
114	17	79	79	Indel	0,41	4.699	0	41	4.700	0	40
115	17	86	86	PolyT (7)	0,22	5.153	0	7	5.156	0	4
116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5.039	0	1	5.039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4.020	0	0	4.020	0	0
118	18	91	91	N/A	0,37	5.460	0	0	5.460	0	0
119	18	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	4.132	0	8	4.131	0	9
120	18	75	75	PolyA (5), Indel	0,37	4.475	0	85	4.480	0	79
121	18	81	81	CTC(3), Indel	0,47	4.860	0	0	4.860	0	0
122	18	85	85	CT(3), Indel	0,45	5.098	0	2	5.098	0	2
123	18	65	65	N/A	0,48	3.900	0	0	3.900	0	0
124	19	99	99	N/A	0,59	5.926	0	14	5.924	0	16
125	19	74	74	N/A	0,68	4.440	0	0	4.438	0	2
126	19	70	70	N/A	0,64	4.199	0	1	4.200	0	0
127	20	94	94	N/A	0,61	5.640	0	1	5.638	0	3
128	20	82	82	AC(3)	0,59	4.920	0	0	4.920	0	0

129	20	76	76	CT(3)	0,58	4.559	0	1	4.558	0	2
130	20	70	70	GT(3),TG(4), Indel	0,46	4.200	0	0	4.200	0	0
131	20	101	101	Indel	0,63	6.060	0	0	6.060	0	0
132	20	67	67	Indel	0,36	4.020	0	31	4.020	0	25
133	20	91	88	PolyG (6)	0,73	5.277	0	3	5.274	0	6
134	20	87	87	Indel	0,57	5.218	0	2	5.218	0	2
135	21	66	66	Indel	0,35	3.959	0	1	3.957	0	3
136	21	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	5.880	0	0	5.880	0	0
137	21	87	87	GT(3), Indel	0,39	5.220	0	0	5.220	0	0
138	21	69	69	PolyA (6), AG(3), Indel	0,32	4.119	0	31	4.113	0	37
139	21	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	5.399	0	1	5.399	0	1
140	22	100	100	Indel	0,63	5.998	0	7	5.997	0	5
141	22	97	97	N/A	0,68	5.819	0	1	5.819	0	1
142	22	97	97	Indel	0,46	5.818	0	2	5.816	0	4
143	22	99	99	N/A	0,6	5.940	0	0	5.940	0	0
144	22	92	92	Indel	0,66	5.519	0	1	5.519	0	1
145	X	69	69	PolyT (5)	0,26	4.139	0	1	4.140	0	0
146	X	69	69	PolyC (5)	0,62	4.136	0	4	4.137	0	3
147	X	71	71	N/A	0,52	4.260	0	0	4.260	0	0
148	Y	65	0	N/A	0,55	0	0	0	0	0	0

149	Y	91	0	N/A	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

I risultati dello studio di riproducibilità sono stati analizzati in base al singolo operatore utilizzando la frequenza della variante (Tabella 18). Questa analisi ha dimostrato che, per gli operatori, le frequenze delle varianti erano coerenti. Sono presentate le frequenze delle varianti medie alla deviazione standard di +/- 1.

**Tabella 18** Risultati da operatore a operatore per lo strumento MiSeqDx

Intervallo delle frequenze delle varianti	N. varianti univoche	N. totale di varianti analizzate dall'operatore 1	N. totale di varianti analizzate dall'operatore 2	Frequenza della variante media (DS) riportata dall'operatore 1	Frequenza della variante media (DS) riportata dall'operatore 2
Frequenza elevata (circa 100%)	1.112	1.072	1.072	0,96 +/- 0,05	0,96 +/- 0,05
Frequenza media (circa 50%)	3.240	3.151	3.161	0,49 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04
Frequenza bassa (3-7%)	620	618	612	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01

Sono mostrati i risultati dello studio di riproducibilità per ogni campione in base ai dati ottenuti da tutte le otto corse (Tabella 19). Il rilevamento è stato valutato separatamente per ciascun tipo di variante: SNV, inserzioni e delezioni separatamente. Sono state escluse le posizioni di riferimento. Questa analisi dimostra che i risultati per le varianti erano riproducibili sui campioni.

Tabella 19 Concordezza dei risultati di identificazione delle basi dello strumento MiSeqDx per campione

Campione	SNV				Inserzioni				Delezioni			
	N. totale	N. totale TP	N. totale FP	N. totale FN	N. totale	N. totale TP	N. totale FP	N. totale FN	N. totale	N. totale TP	N. totale FP	N. totale FN
GM12877	592	574	2	0	336	336	0	0	228	272	0	0
GM12878	1.456	1.432	0	0	320	304	0	0	384	352	0	0
GM12879	912	896	0	0	336	320	0	0	288	272	0	0
GM12885	1.200	1.192	0	0	400	384	0	0	352	320	0	0
GM12886	1.104	1.104	0	0	368	352	0	0	368	352	0	0
GM12877-D1 <sup>1</sup>	3.640	3.582	0	0	800	760	0	0	960	880	0	0
GM12877-D2 <sup>2</sup>	400	398	0	0	520	516	0	0	560	556	0	0

<sup>1</sup> Varianti con una frequenza superiore al 20%.

<sup>2</sup> Varianti con una frequenza inferiore al 20%.

I dati forniti dalle otto corse di questo studio di riproducibilità dimostrano che lo strumento MiSeqDx è in grado di sequenziare in modo coerente:

- Contenuto in GC  $\geq$  19% (tutte le basi identificate in 120 dei 120 ampliconi sequenziati con 19% di contenuto in GC identificato correttamente con una percentuale di rilevamento non riuscito di 3,4%)
- Contenuto in GC  $\leq$  73% (tutte le basi identificate in 120 dei 120 ampliconi sequenziati con 73% di contenuto in GC identificato correttamente con una percentuale di rilevamento non riuscito di 0,1%)
- Lunghezze PolyA  $\leq$  8 (la ripetizione PolyA di otto nucleotidi era stata identificata correttamente in 120 dei 120 ampliconi sequenziati contenenti PolyA = 8)
- Lunghezze PolyT  $\leq$  10 (la ripetizione PolyT di 10 nucleotidi era stata identificata correttamente in 120 dei 120 ampliconi sequenziati contenenti PolyT = 10)
- Lunghezze PolyG  $\leq$  6 (la ripetizione PolyG di sei nucleotidi era stata identificata correttamente in 720 dei 720 ampliconi sequenziati contenenti PolyG = 6)
- Lunghezze PolyC  $\leq$  6 (la ripetizione PolyC di sei nucleotidi era stata identificata correttamente in 359 dei 360 ampliconi sequenziati contenenti PolyC = 6, con un'identificazione non riuscita)

- Lunghezze di dinucleotidi ripetuti  $\leq 4x$  (tutte le basi identificate in 600 dei 600 ampliconi sequenziati con 4x di ripetizione di dinucleotidi sono state identificate correttamente con una percentuale di rilevamento non riuscito di 0,4%)
- Lunghezze di trinucleotidi ripetuti  $\leq 5x$  (tutte le basi identificate in 120 dei 120 ampliconi sequenziati con 5x di ripetizione di trinucleotide sono state identificate correttamente con una percentuale di rilevamento non riuscito di 1,9%)
- 24 o meno inserzioni delle basi e 25 o meno delezioni della basi
  - 24 inserzioni delle basi identificate correttamente in 120 dei 120 campioni
  - 25 delezioni delle basi identificate correttamente in 182 campioni e riportate come identificazione non riuscita in due campioni dei 184 campioni

## Studio 2

È stato condotto uno studio esterno per valutare la riproducibilità del saggio rappresentativo di due geni, descritto nello Studio 2 sull'accuratezza, in tre siti di analisi esterni (due operatori per sito), un lotto di reagenti e tre giorni di analisi non consecutivi. L'analisi è stata condotta con sei pannelli di campioni ben caratterizzati di campioni di DNA genomico ottenuti da campioni clinici in FFPE o linee cellulari. Ciascun pannello consisteva di 10 membri, per un totale di 60 membri nei pannelli.

I 60 membri del pannello consistevano di duplicati di quattro campioni wild-type univoci (per le mutazioni del pannello), 12 campioni di mutazioni univoche (con una singola mutazione) preparati sia al livello alto che al livello basso della frequenza della mutazione e due campioni di mutazione univoca (con una sola mutazione) preparati solo al livello basso della frequenza della mutazione. Ciascun campione univoco a livello di frequenza campione/mutazione (analizzato in duplicati in ogni corsa) presentava 36 possibili risultati (due replicati  $\times$  due operatori  $\times$  tre giorni  $\times$  3 siti) se tutti i risultati erano validi.

L'identificazione prevista espressa in percentuale (Percent Expected Call, PEC) su tutte le varianti positive e negative sono state valutate confrontando il risultato del saggio rappresentativo con il risultato della mutazione prevista (mutazione prevista rilevata o non rilevata) in ciascun campione. La PEC è calcolata come 100% delle volte il numero di identificazioni previste per il numero di identificazioni tentate. L'intervallo di confidenza bilaterale del 95% è calcolato utilizzando il metodo del punteggio Wilson.

Combinando i siti, le percentuali di superamento dei campioni era  $\geq 94,7\%$  per la prima corsa del campione o nei campioni analizzati nelle corse che erano validi al primo passaggio "first pass". La PEC a livello di mutazione su tutti i campioni contenenti mutazioni era di 99,6% (905/909) (IC 95%; 98,9, 99,8). Il numero delle identificazioni tentate su tutte le 56 mutazioni del pannello (indipendentemente dal fatto che una mutazione rilevata fosse prevista o no) per tutti i campioni validi era 58.856 ( $56 \times 1.051$ ). Di queste 58.856 osservazioni a livello di mutazione, erano presenti solo sei incidenti in cui i risultati osservati e previsti erano discordanti; la PEC su tutte le varianti positive e negative da tutti membri combinati del pannello di mutazione e wild-type era di 99,99% (58.850/58.856).

## Sensibilità analitica: limite del campione bianco (Limit of Blank, LoB) e limite del rilevamento (Limit of Detection, LoD)

Questo studio ha verificato il valore di cutoff del saggio e determinato il limite del rilevamento (LoD) per MiSeqDx con un pannello rappresentativo. In breve, le linee cellulari ben caratterizzate GM12878 e GM12877 Platinum Genome erano campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina dai quali è stato estratto il DNA. GM12878 è stato diluito con GM12877 in modo che le frequenze delle varianti di settanta varianti (52 SNV, nove inserzioni e nove delezioni) erano prossime allo 0,05. I due campioni di DNA sono stati analizzati da due operatori, utilizzando due strumenti e due lotti di reagenti, per un totale di 10 corse di sequenziamento MiSeqDx. In questo modo sono stati ottenuti 40 replicati per ciascuna variante in GM12878 e 60 replicati per ciascuna coordinata wild-type corrispondente in GM12877 per ciascun lotto di reagenti. LoB e LoD sono stati calcolati con l'approccio classico indicato da CLSI EP17-A2 utilizzando l'opzione non parametrica. LoB e LoD sono stati calcolati per SNV, inserzioni e delezioni separatamente raggruppando in pool le frequenze delle varianti per un dato tipo di variante. L'errore di tipo I era definito come 0,01 e l'errore di tipo II era definito come 0,05.

Per LoB, le frequenze delle varianti raggruppate in pool sono state ordinate dalla più bassa alla più alta ed è stata calcolata la posizione 99 per ciascun lotto di reagenti per ciascun tipo di variante (Tabella 20). Il software MiSeqDx utilizza un valore di cutoff (l'effettivo LoB) di 0,026 di frequenza della variante per determinare il rilevamento qualitativo delle varianti. I limiti calcolati del campione bianco hanno verificato che questo cutoff ha comportato un errore di tipo I di non più di 0,01.

**Tabella 20** Limite del bianco

Tipo di variante	Numero totale delle frequenze delle varianti	LoB del lotto di reagenti 1 (%)	LoB del lotto di reagenti 2 (%)
SNV	3.120	0,87	0,75
Inserzione	540	0,79	0,60
Delezione	540	0,96	0,84

Per LoD, è stata calcolata la percentuale della frequenza delle singole mutazioni per ciascun lotto di reagenti per ciascun tipo di variante che risultava al di sotto del valore di cutoff di 0,026 (Tabella 21). Poiché le percentuali erano inferiori rispetto all'errore di tipo II del 5% (0,05), la mediana delle frequenze combinate delle varianti sono state calcolate come il valore LoD (Tabella 22). Il valore LoD per ciascun tipo di variante è stato preso come il più grande dei due valori calcolati per i due lotti di reagenti: 5,45% per le SNV, 4,88% per le inserzioni e 5,44% per le delezioni.

**Tabella 21** Limite di rilevamento

Lotto di reagenti	Tipo di variante	Numero totale delle frequenze delle varianti	N. di misurazioni VF < 2,6%	% di misurazioni VF < 2,6%	Limite di rilevamento (%)
1	SNV	2.080	5	0,20	5,45
	Inserzione	360	0	0,00	4,86
	Delezione	360	3	0,80	5,44
2	SNV	2.080	26	1,30	5,44
	Inserzione	360	0	0,00	4,88
	Delezione	360	0	0,00	5,24



Gli studi seguenti dimostrano le caratteristiche delle prestazioni di MiSeqDx con un altro saggio rappresentativo che mira a 56 mutazioni in due geni del cancro rilevanti dal punto di vista clinico (pannello delle mutazioni). Il pannello delle mutazioni è stato progettato per rilevare specificatamente le 56 mutazioni in due geni del cancro rilevanti dal punti di vista clinico (Gene 1 e Gene 2). Il saggio determina contemporaneamente la presenza o l'assenza di ciascuna delle 56 mutazioni in ogni campione sequenziato. Il metodo di riferimento per questi studi è stato il sequenziamento bidirezionale Sanger.

### Precisione da lotto a lotto

È stato condotto uno studio di precisione da lotto a lotto per valutare le prestazioni dello strumento MiSeqDx su lotti di kit di reagenti fabbricati (che consistono di qualificazione del campione, preparazione delle librerie e reagenti per il sequenziamento) utilizzando un saggio rappresentativo di due geni con un pannello di cinque campioni in FFPE misti che soddisfacevano i requisiti di qualificazione. Ciascun campione in FFPE conteneva due mutazioni univoche: una al livello più basso di frequenza della mutazione (circa 8%) e una al livello più alto di frequenza della mutazione (circa 14%). Dodici (12) osservazioni di ciascuno dei cinque campioni misti sono stati raccolti in tre giorni non consecutivi con tre lotti di kit di reagenti. Il numero totale di osservazioni per lo studio su tutti i lotti di reagenti era di 180 osservazioni su tutti i campioni misti e 360 osservazioni su tutti i livelli di frequenza della mutazione. Su tutti i lotti e giorni, il 99,7% (359/360) delle osservazioni hanno mostrato il risultato della mutazione prevista. Una mutazione a bassa frequenza è stata erroneamente identificata come wild-type. È stata eseguita un'analisi dei componenti della variazione per ciascun livello di frequenza di mutazioni/mutazione per stimare la variabilità del sistema. La deviazione standard totale era compresa tra 0,011 e 0,029. Il componente del lotto di reagenti della deviazione standard totale era compresa tra 0 e 0,015.

## 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 simili 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, TruSeq, 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.

## Informazioni di contatto



Illumina

5200 Illumina Way

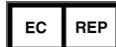
San Diego, California 92122 U.S.A.

+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

Per un riferimento completo dei simboli che si trovano sulla confezione del prodotto e sull'etichettatura, fare riferimento alla legenda dei simboli alla pagina Web [support.illumina.com](http://support.illumina.com) sulla scheda *Documentation and Literature* (Documentazione e letteratura) per il kit in uso.