

Inserto della confezione

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

Uso previsto

TruSight™ Whole Genome è un dispositivo diagnostico qualitativo *in vitro* destinato al sequenziamento e al rilevamento dell'intero genoma di varianti a singolo nucleotide, inserzione/delezioni, varianti del numero di copie, cicli di omozigosi, espansioni di ripetizioni in tandem brevi e variazioni mitocondriali nel DNA genomico umano estratto dal sangue.

TruSight Whole Genome include TruSight Whole Genome Dx Library Prep con gli indici UD e il Software TruSight Whole Genome Analysis Application. Il dispositivo è destinato all'uso con applicazioni germline compatibili a valle per lo sviluppo di saggi diagnostici *in vitro* e da parte di personale di laboratorio qualificato e sviluppatori di saggi.

TruSight Whole Genome è previsto per l'uso su NovaSeq™ 6000Dx Instrument.

Riepilogo e descrizione

TruSight Whole Genome è un saggio di sequenziamento di nuova generazione che utilizza la preparazione delle librerie senza PCR basata sulla tagmentazione, a partire dal DNA genomico (genomic DNA, gDNA) estratto dal sangue umano intero periferico, e il sequenziamento e l'analisi primaria su Illumina® NovaSeq 6000Dx Instrument.

L'analisi secondaria viene eseguita con il software TruSight Whole Genome Analysis Application su Illumina DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx incluso e richiesto e include demultiplex, allineamento al genoma di riferimento umano GrCh38/hg38 e identificazione delle varianti, nonché annotazione e applicazione delle specifiche metriche di controllo di qualità (CQ) riportate nella [Tabella 1](#) per garantire le prestazioni analitiche. Gli output del saggio includono report del CQ di corsa e campioni e file in formato di identificazione delle varianti (VCF) del genoma da utilizzare con il software di analisi terziaria e reportistica a valle compatibile.

TruSight Whole Genome valuta ampiamente le varianti genomiche nelle regioni codificanti e non codificanti del genoma umano. La valutazione delle varianti include il rilevamento di varianti piccole, varianti del numero di copie (CNV), corse di omozigosi (ROH) ed espansioni di ripetizioni in tandem brevi (STR). Inoltre, TruSight Whole Genome rileva l'assenza dell'allele c.840C di SMN1 (NM_000344.3:c.840C>T), che potrebbe indicare la delezione del gene SMN1 o la conversione del gene SMN1/SMN2.^{1,2} La perdita biallelica dell'allele c.840C di SMN1 è responsabile di circa il 95% dei casi di atrofia muscolare spinale (SMA).³

La [Tabella 2](#) fornisce informazioni sui tipi di varianti convalidati con TruSight Whole Genome.

Tabella 1 Specifiche delle metriche di qualità di TruSight Whole Genome

Tipo di output	Metrica	Specifica
CQ della corsa di sequenziamento	% totale \geq Q30	$\geq 85,0$
CQ FASTQ	Resa per campione (bps)	$\geq 90.000.000.000$
CQ campioni libreria	Copertura autosomica media	$\geq 35,0$
	Percentuale di autosomi con copertura superiore a 20X	$\geq 93,94$
	Copertura normalizzata dal 60% al 79% degli intervalli GC	$0,82 \leq x \leq 1,13$
	Copertura normalizzata dal 20% al 39% degli intervalli GC	$0,97 \leq x \leq 1,06$
	Copertura mitocondriale media	$\geq 500,0$
	Percentuale basi Q30	$\geq 85,0$
	Contaminazione stimata del campione	$\leq 0,005$

Tabella 2 Varianti rilevate convalidate con TruSight Whole Genome

Tipo di variante	Rilevamento delle varianti convalidate
Varianti piccole	Varianti a singolo nucleotide (SNV), inserzioni/delezioni brevi (1-31 bp)
Varianti del numero di copie (CNV)	Guadagni e perdite ≥ 10 kb
Corse di omozigosi (ROH)	≥ 500 kb
SNV mitocondriali	% di eteroplasmia se $\geq 4,75\%$
Espansioni di ripetizioni in tandem brevi (STR)	Loci target (AFF2, AR, ATN1, ATXN1, ATXN10, ATXN2, ATXN3, ATXN7, ATXN8OS, C9ORF72, CACNA1A, CBL, CNBP, CSTB, DIP2B, DMPK, FMR1, FXN, GLS, HTT, JPH3, NIPA1, NOP56, NOTCH2NL, PABPN1, PHOX2B, PPP2R2B e TBP)
Variante SMN1	NM_000344,3:c.840C/T

Principi della procedura

TruSight Whole Genome è destinato alla preparazione di librerie senza PCR per produrre dati di sequenziamento dell'intero genoma umano. Il saggio inizia con la preparazione di librerie dal DNA genomico quantificato estratto dal sangue intero umano periferico, include il sequenziamento e l'analisi su NovaSeq 6000Dx Instrument utilizzando TruSight Whole Genome Analysis Application e termina con l'identificazione e l'annotazione delle varianti.

Il saggio TruSight Whole Genome consiste nelle seguenti fasi:

- **Pianificazione dei lotti e Creazione delle corse:** si consiglia vivamente di pianificare il lotto e le corse prima di iniziare la preparazione delle librerie. È possibile preparare fino a 24 librerie di campioni in un lotto di preparazione delle librerie. In base al numero di campioni, possono essere utilizzate diverse configurazioni di celle a flusso (6-plex su S2 e 16-plex su S4). L'ID della provetta della libreria, i nomi dei campioni e l'indicizzazione corrispondente vengono registrati durante la pianificazione e la creazione della corsa. Per ulteriori informazioni sulla creazione della corsa, consultare Guida TruSight Whole Genome Analysis Application (documento n. 200049931). Seguire il lotto pianificato durante l'esecuzione del flusso di lavoro di preparazione delle librerie.
- **Preparazione del protocollo:** alcuni reagenti sono congelati e devono essere portati a temperatura ambiente. A causa del breve flusso di lavoro, è possibile completare la preparazione e iniziare il sequenziamento nello stesso giorno. Pertanto, durante questa fase è possibile scongelare anche i materiali di consumo per il sequenziamento per le corse pianificate. I campioni di DNA genomico quantificato vengono scongelati e diluiti per ottimizzare l'input di DNA.
- **Preparazione delle librerie**
 - **Tagment Genomic DNA** (Tagmentazione del DNA genomico): utilizza Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF) per la tagmentazione dell'input di DNA. Durante la tagmentazione, il gDNA viene frammentato, marcato con adattatori e immobilizzato sulla superficie delle microsfere magnetiche BLT-PF.
 - **Post Tagmentation Cleanup** (Pulizia post-tagmentazione): pulisce il DNA marcato con adattatori su BLT-PF e rimuove il tampone di arresto per preparare agli Indici di legatura.
 - **Ligate Indexes** (Indici di legatura): aggiunge indici doppi univoci alle librerie per abilitare il multiplexing. Eseguie l'estensione delle lacune ed eluisce le librerie di DNA a singolo filamento dalle microsfere.
 - **Size-Selection and Clean Up Libraries** (Selezione delle dimensioni e Pulizia delle librerie): una procedura di purificazione delle microsfere con selezione delle dimensioni su due lati rimuove i frammenti troppo piccoli e troppo grandi per raggiungere una lunghezza mediana del frammento di circa 450 bp, intervallo da ~360 a 550 bp.
 - **Pool and Denature Libraries** (Raggruppamento in pool e denaturazione delle librerie): la funzione di auto-normalizzazione di BLT-PF consente il raggruppamento in pool per volume senza qPCR o altra normalizzazione. Il volume specificato di ciascuna libreria viene raggruppato in pool in base al piano per ciascuna corsa e denaturato con 0,2N di NaOH (HP3 diluito). Il pool denaturato viene quindi trasferito nella provetta della libreria NovaSeq 6000Dx con l'ID corrispondente alla corsa pianificata.
- **Sequencing and Analysis** (Sequenziamento e analisi): i materiali di consumo nella configurazione S2 e/o S4 vengono caricati in NovaSeq 6000Dx Instrument, incluse una o più provette della libreria NovaSeq 6000Dx associate con librerie raggruppate in pool. Al momento del caricamento, l'ID della provetta della libreria viene scansionato e, se inserito durante la pianificazione della corsa, viene utilizzato per selezionare la corsa pianificata corrispondente. In caso contrario, la corsa pianificata associata deve essere selezionata manualmente.

Le librerie raggruppate in pool vengono clusterizzate su una cella a flusso e poi sequenziate utilizzando la chimica di sequenziamento mediante sintesi (SBS) in NovaSeq 6000Dx. La chimica SBS utilizza un metodo che fa uso di terminatori reversibili per rilevare le singole basi nucleotidiche marcate con colorante fluorescente man mano che vengono incorporate in filamenti di DNA in estensione.

Il software Real-Time Analysis (RTA) esegue l'analisi primaria che include l'identificazione delle basi e assegna un punteggio qualitativo a ciascuna identificazione delle basi. I dati dell'analisi primaria vengono trasferiti automaticamente al server Illumina DRAGEN.

Il demultiplex e l'analisi DRAGEN vengono eseguiti automaticamente utilizzando TruSight Whole Genome Analysis Application. Nell'ambito di questa analisi, ogni corsa e libreria di campioni viene esaminata per verificarne la validità utilizzando le metriche analitiche descritte in [Controlli di qualità a pagina 34](#) e i risultati vengono forniti in report di campioni consolidati e individuali. Per le librerie di campioni valide, vengono generati file di formato di identificazione delle varianti (VCF) del genoma annotato. Per ulteriori informazioni sul flusso di lavoro di analisi, consultare la Guida TruSight Whole Genome Analysis Application (documento n. 200049931).

Limiti della procedura

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- TruSight Whole Genome è compatibile con il DNA genomico derivato da sangue intero periferico umano.
- Il saggio non include reagenti per l'estrazione o la quantificazione del DNA. I risultati dei test analitici, comprese le [Sostanze interferenti a pagina 38](#), sono stati ottenuti con sangue intero utilizzando kit di estrazione del DNA rappresentativi e kit di quantificazione del DNA. Per tutti i test diagnostici sviluppati per essere eseguiti con TruSight Whole Genome è richiesta la piena convalida rispetto a ogni aspetto della prestazione con i kit di estrazione del DNA e di quantificazione del DNA di propria scelta.
- Il saggio è stato configurato e analizzato per il numero di plex del campione e per i set di indici indicati nella tabella seguente.

Dimensione del lotto di preparazione delle librerie	Numero di plex	Configurazione corsa	Indicizzazione
6, 12, 18 o 24 campioni	6 plex	1-4 corse S2	Set S2 da 1 a 4
16 campioni	16 plex	1 corsa S4	Set S4 1 o 2
22 campioni	16 plex + 6 plex	1 corsa S4 + 1 corsa S2	Set S4 1 o 2, Set S2 da 1 a 4 (non utilizzato per S4)

- Il saggio non applica il tracciamento positivo del campione. Anche se il risultato del CQ del riepilogo della ploidia riportato dal software può facoltativamente essere utilizzato per identificare gli scambi di campioni, non identificherà i maschi scambiati con maschi o le femmine scambiate con femmine.

- Il saggio fornisce solo la convalida fino all'output dei file VCF del genoma. Per tutti i test diagnostici sviluppati per essere eseguiti con TruSight Whole Genome è richiesta la piena convalida per ogni aspetto della prestazione con le applicazioni di valle di propria scelta.
- Il saggio non riporta le identificazioni delle varianti per i campioni che non superano il controllo di qualità.
- Il saggio definisce livelli di affidabilità elevati solo per SNV e inserzioni/delezioni 1-5 bp a causa dei criteri rigorosi utilizzati per definire un contesto genomico come affidabilità elevata per un dato tipo di variante nella [Determinazione del livello di affidabilità delle varianti piccole a pagina 39](#).
- Il saggio è disegnato per valutare le CNV nell'intero genoma refertabile, a prescindere dal contesto genomico, ed esclude le regioni con caratteristiche che riflettono i limiti del genoma di riferimento, come centromeri, telomeri e CNV comuni che vengono segregate nelle popolazioni.
- Le prestazioni del saggio non sono state valutate per le varianti del numero di copie inferiori a 10 kb.
- Il saggio non riporta traslocazioni, inversioni o riarrangiamenti bilanciati.
- Le prestazioni del saggio non sono state valutate per le inserzioni o le delezioni del DNA mitocondriale (mtDNA).
- Il saggio riporta solo i risultati per i loci STR elencati nella [Tabella 2](#). Quando le lunghezze di espansione delle STR reali superano circa 135 bp, la lunghezza osservata sarà spesso una sottostima della lunghezza effettiva a causa delle limitazioni tecniche delle letture brevi, con questo effetto ancora più pronunciato per FMR1. Una volta che la lunghezza effettiva delle STR supera la lunghezza mediana del frammento (~330 bp), la lunghezza delle STR stima i plateau.
- Il saggio non riporta il numero di copie di SMN1 o SMN2.
- Il saggio non rilascia affermazioni sulla patogenicità delle varianti rilevate.

Componenti del prodotto

TruSight Whole Genome è composto da:

- TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes, 24 sample (n. di catalogo 20093209)
e
- TruSight Whole Genome Analysis Application (n. di catalogo 20106190, installato da personale Illumina formato)

Reagenti

Reagenti forniti

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 1, PN 20072256

Nome reagente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF)	1	460 µl	Streptavidin magnetic beads collegate a transposomi in soluzione acquosa tamponata.	Tra -25 °C e -15 °C
Extension Ligation Mix (ELM)	1	1,6 ml	Ligasi, DNA polimerasi e dNTP in soluzione acquosa tamponata.	Tra -25 °C e -15 °C
2N NaOH (HP3)	1	400 µl	Soluzione di idrossido di sodio 2N (NaOH).	Tra -25 °C e -15 °C
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	290 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente sale di magnesio e dimetilformammide.	Tra -25 °C e -15 °C

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 2, PN 20072257

Nome reagente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Tagmentation Wash Buffer 2 (TWB2)	1	41 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente detergente e sale.	Tra 15 °C e 30 °C
Resuspension Buffer (RSB)	1	20 ml	Soluzione acquosa tamponata.	Tra 15 °C e 30 °C
Cleanup Beads (CB)	1	10 ml	Microsfere paramagnetiche in fase solida in soluzione acquosa tamponata.	Tra 15 °C e 30 °C
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	1,4 ml	Soluzione detergente in acqua.	Tra 15 °C e 30 °C
Neutralization Buffer (NB)	1	450 µl	Soluzione Tris-HCl.	Tra 15 °C e 30 °C

TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes, PN 20072258

Nome reagente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
UDI PCR-Free (32 Indexes)	1	37 µl	Adattatori indici doppi esclusivi (UD) disposti nella piastra.	Tra -25 °C e -15 °C

Materiali di consumo necessari, non in dotazione

- Etanolo, 100% (200 proof), per biologia molecolare
- Acqua certificata priva di RNasi/DNasi
- NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cicli) (n. di catalogo 20046931)
- NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cicli) (n. di catalogo 20046933)
- NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (n. di catalogo 20062292)
- NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (n. di catalogo 20062293)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube (n. di catalogo 20062290)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (n. di catalogo 20062291)

Conservazione e manipolazione

- Per temperatura ambiente si intende la temperatura compresa tra 15 °C e 30 °C.
- Se la confezione o i contenuti dei componenti di TruSight Whole Genome Dx Library Prep sono danneggiati o compromessi, contattare l'Assistenza clienti Illumina.
- I reagenti sono stabili se conservati come indicato fino alla data di scadenza indicata sulle etichette dei kit. Per le condizioni di conservazione, consultare [Reagenti forniti a pagina 6](#). Conservare i componenti del saggio alla temperatura specificata e non utilizzare reagenti scaduti. Non scambiare i componenti di lotti di kit differenti. I lotti dei kit sono identificati sulle etichette della scatola.
- Cambiamenti nell'aspetto fisico dei reagenti possono indicare un deterioramento dei materiali. Se si verificano cambiamenti nell'aspetto fisico (ad es, evidenti cambiamenti nel colore del reagente o intorbidimento), non usare i reagenti. Se si osservano precipitati per ST2, riscaldare a 37 °C per 10 minuti, quindi miscelare tramite vortex fino alla dissoluzione del precipitato.
- La stabilità di TruSight Whole Genome Dx Library Prep è stata valutata e le prestazioni sono state dimostrate per un massimo di quattro utilizzi delle provette congelate, quando vengono congelate tra un utilizzo e l'altro.

Apparecchiature e materiali

Apparecchiature richieste, non fornite

Verificare lo stato di calibrazione dell'apparecchiatura prima di avviare il saggio.

Apparecchiatura	Fornitore
Vortex con capacità di 3.000 giri/min, fondo o contenitore piatto	Fornitore di laboratorio generico
Incubatore per microcampioni calibrato per garantire una precisione di temperatura di ± 2 °C	SciGene, n. di catalogo 1057-30-O (o equivalente)
Inserto per incubatore per microcampioni per piastre MIDI a 96 pozzetti	Illumina, n. di catalogo BD-60-601
Microcentrifuga	Fornitore di laboratorio generico
Centrifuga per micropiastre a 96 pozzetti	Fornitore di laboratorio generico
Shaker per piastre con le specifiche seguenti: <ul style="list-style-type: none"> • Capacità di agitare a 1.800 rpm • Orbita di miscelazione costante 2 mm • Accuratezza della miscelazione ± 25 rpm 	VWR, n. di catalogo 1808-0506 (o equivalente)
Cuneo o rullo sigillante	Fornitore di laboratorio generico
Supporto magnetico con le seguenti specifiche: <ul style="list-style-type: none"> • Progettato per la precipitazione/separazione di microsfere paramagnetiche • Magneti sul lato del supporto, non sul fondo • Per piastre MIDI a 96 pozzetti 	Thermo Fisher Scientific. n. di catalogo AM10027 (o equivalente)
NovaSeq 6000Dx Instrument	Illumina, n. di catalogo 20068232

Apparecchiatura	Fornitore
Pipette di precisione (a canale singolo): <ul style="list-style-type: none"> • 10 µl • 20 µl • 200 µl • 1.000 µl Pipette di precisione (a 8 canali): <ul style="list-style-type: none"> • 20 µl • 200 µl Assicurarsi che le pipette siano calibrate regolarmente e con una precisione del 5% rispetto al volume dichiarato	Fornitore di laboratorio generico
Dosatore pipette	Fornitore di laboratorio generico

Materiali richiesti, non forniti

Prima di avviare il protocollo, verificare di disporre dei materiali richiesti.

Il protocollo è stato ottimizzato e convalidato utilizzando i materiali elencati. Se si utilizzano materiali differenti, non sono garantite prestazioni confrontabili.

Materiali	Fornitore
Pipette sierologiche da 5 ml	Fornitore di laboratorio generico
Pipette sierologiche da 10 ml	Fornitore di laboratorio generico
Sigillo adesivo per piastre a 96 pozzetti con le seguenti specifiche: <ul style="list-style-type: none"> • Poliestere rimovibile otticamente trasparente • Adesivo forte in grado di resistere a più sbalzi di temperatura da -40 °C a 110 °C • Privo di DNasi/RNasi 	Fornitore di laboratorio generico
Provette per microcentrifuga, prive di nucleasi (da 1,5, 1,7 o 2,0 ml, a meno che non sia specificato come 0,5 ml)	Fornitore di laboratorio generico
Serbatoi di reagente privi di nucleasi, da 50 ml o equivalente (PVC, vaschetta monouso)	Fornitore di laboratorio generico
Provette coniche da 15 ml	Fornitore di laboratorio generico
Provette coniche da 50 ml	Fornitore di laboratorio generico

Materiali	Fornitore
Punte per pipette dotate di barriera aerosol da 20 µl	Fornitore di laboratorio generico
Punte per pipette dotate di barriera aerosol da 200 µl	Fornitore di laboratorio generico
Punte per pipette dotate di barriera aerosol da 1.000 µl	Fornitore di laboratorio generico
Piastre di conservazione a 96 pozzetti, 0,8 ml (piastra MIDI)	Thermo Fisher Scientific, n. codice AB-0859 (o equivalente)
Piastre PCR a 96 pozzetti, da 0,2 ml (polipropilene privo di RNasi/DNasi, a basso legame)	Fornitore di laboratorio generico
Contenitore del ghiaccio e ghiaccio	Non applicabile
Campioni di DNA genomico quantificato	Non applicabile

Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni



ATTENZIONE

Manipolare tutti i campioni come agenti potenzialmente infettivi.

- Seguire le procedure di sicurezza, compreso l'uso dei DPI, durante la raccolta, il trasporto, la conservazione e il trattamento dei campioni di sangue umano.
- Il trasporto di sangue intero deve essere conforme alle regolamentazioni nazionali, federali e statali per il trasporto di agenti eziologici.
- Prelevare 2–5 ml di sangue intero periferico in provette con EDTA e conservare a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per un massimo di cinque settimane prima dell'estrazione.
- Non sono stati osservati eventi avversi sulle prestazioni del saggio con campioni di sangue intero con elevati tassi di bilirubina, emoglobina, trigliceridi, biotina o EDTA. Consultare Sostanze interferenti.
- TruSight Whole Genome è compatibile con i kit e i protocolli di estrazione disponibili in commercio appropriati per l'uso nel sequenziamento di nuova generazione (NGS). Consultare [Valutazione del metodo di estrazione del DNA a pagina 37](#).
- TruSight Whole Genome è compatibile con il DNA eluito in una soluzione tamponata Tris contenente ≤10 mM di EDTA, come 10 mM di Tris, 1 mM di EDTA a pH 8,0 (TE).
- Si raccomanda l'eluizione e la conservazione del DNA in TE. Per garantire la stabilità, evitare la conservazione in acqua.

Raccomandazioni in merito agli input di DNA

- Prima di iniziare il saggio TruSight Whole Genome, quantificare il DNA genomico estratto dal sangue intero utilizzando qualsiasi metodo di quantificazione fluorometrica che utilizza coloranti leganti gli acidi nucleici. Si raccomanda che i gDNA dei campioni destinati a un particolare lotto di preparazione delle librerie e a una corsa di sequenziamento siano quantificati insieme per eliminare la variabilità da lotto a lotto, quando possibile, oppure che si utilizzino controlli di processo per garantire una variabilità della quantificazione del DNA da lotto a lotto $\leq 25\%$.
- Evitare di pipettare piccoli volumi di campione ($< 2 \mu\text{l}$) per garantire una quantificazione e un input accurati del DNA.
- TruSight Whole Genome Dx Library Prep richiede DNA sufficiente per saturare le microsfere BLT-PF per un'efficace auto-normalizzazione delle rese delle librerie e prestazioni ottimali. A causa della variazione dei risultati dei diversi metodi di quantificazione, la tabella seguente fornisce l'input di DNA raccomandato per tre metodi di quantificazione per garantire prestazioni ottimali del saggio. L'uso di altri metodi di quantificazione può richiedere l'ottimizzazione. Consultare [Sensibilità dell'input di DNA a pagina 38](#).

Metodo Quant	Input di DNA target (ng)	Concentrazione minima di soluzione madre di DNA
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit	280	11,2 ng/ μl
Qubit dsDNA Broad-Range (BR) Assay Kit	280	11,2 ng/ μl
AccuClear Ultra High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit	350	14 ng/ μl

Raccomandazioni sulle competenze

La competenza dell'operatore e la riuscita dell'implementazione del saggio possono essere valutate eseguendo il flusso di lavoro completo una volta secondo le istruzioni per l'uso. Questo flusso di lavoro può essere eseguito con una singola preparazione delle librerie di 6 campioni e una corsa di sequenziamento utilizzando una cella a flusso S2 o una singola preparazione delle librerie di 16 campioni e una corsa di sequenziamento utilizzando una cella a flusso S4. La riuscita è indicata dal superamento delle metriche del CQ della corsa e della libreria registrate nell'output del report consolidato dal software TruSight Whole Genome Analysis Application. Consultare Guida TruSight Whole Genome Analysis Application (documento n. 200049931).

Illumina raccomanda l'inclusione di campioni di DNA genomico estratti da sangue intero periferico che soddisfino i criteri di qualificazione della concentrazione e del volume della soluzione madre di DNA per dimostrare una corretta integrazione del saggio con i processi del laboratorio a monte come la raccolta e la

conservazione dei campioni e le procedure di estrazione e quantificazione del DNA. Possono essere utilizzati anche campioni di riferimento di DNA genomico disponibili in commercio derivati da un singolo donatore umano come NA24385/HG002 (National Institute of Standards e Technology Genome in a Bottle Consortium).

In caso di problemi, consultare la sezione [Risoluzione dei problemi a pagina 69](#) per le azioni consigliate e contattare l'assistenza tecnica Illumina.

Avvertenze e precauzioni

- **Alcuni componenti di questo 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. Manipolare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni pertinenti a livello regionale, nazionale e locale.** Le schede di sicurezza (SDS) sono disponibili alla pagina support.illumina.com/sds.html.
- Riferire immediatamente qualsiasi incidente serio relativo a questo prodotto a Illumina e alle autorità competenti degli stati membri nei quali l'utente e il paziente sono residenti.
- Maneggiare tutti i campioni come se fossero infetti.
- Adottare le normali precauzioni di laboratorio. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere o fumare nelle aree designate per il lavoro. Manipolare i campioni e i reagenti del saggio indossando guanti e indumenti da laboratorio monouso. Dopo aver maneggiato i campioni e i reagenti del saggio lavarsi bene le mani.
- Questo saggio contiene polietilenglicole. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali.
- Questo saggio contiene idrossido di sodio. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali.
- Le procedure di preparazione delle librerie richiedono un ambiente privo di RNasi/DNasi. Decontaminare accuratamente le aree di lavoro con un detergente inibitore di RNasi/DNasi.
- Utilizzare provette da microcentrifuga, piastre, punte di pipette e serbatoi privi di nucleasi.
- Utilizzare apparecchiature calibrate per tutte le fasi del saggio. Assicurarsi di calibrare le apparecchiature alle velocità, temperature e volumi specificati in questo protocollo.
- Utilizzare pipette di precisione per garantire un'accurata erogazione di reagenti e campioni. Calibrare regolarmente secondo le specifiche del produttore.
- Assicurarsi di utilizzare le apparecchiature specificate per il test e di impostare i programmi come indicato.
- Le temperature dichiarate per l'incubatore di microcampioni indicano la temperatura impostata di reazione, non necessariamente la temperatura sull'apparecchiatura.
- Non scambiare i componenti di diversi lotti di TruSight Whole Genome Dx Library Prep. I lotti sono identificati sull'etichetta della scatola del saggio.

- Per evitare che le nucleasi e i prodotti per PCR contaminino i reagenti, la strumentazione, i campioni e le librerie, è necessario attivare prassi di laboratorio adeguate. La contaminazione da nucleasi e prodotti per PCR può causare risultati inesatti e inaffidabili.
- Per avere prestazioni del saggio e condizioni di conservazione ottimali, è necessario utilizzare tipi di piastra appropriati. Per il trasferimento della piastra attenersi a quanto riportato nelle [Istruzioni per l'uso a pagina 16](#).
- Possono verificarsi contaminazione incrociata o perdita di campione se le sigillature della piastra non vengono applicate o rimosse con attenzione (consultare [Manipolazione delle piastre di preparazione delle librerie a pagina 14](#)).
- Il mancato rispetto delle procedure descritte può causare risultati errati o una significativa riduzione della qualità delle librerie.
- Conservare i reagenti o i componenti del saggio alla temperatura indicata.
- Non conservare i reagenti in un'unità di conservazione antibrina.
- Non utilizzare reagenti conservati in modo improprio.
- Non utilizzare alcun componente oltre la data di scadenza indicata.
- Preparare 0,2N di NaOH (HP3 diluito) fresco il giorno dell'uso ed eliminare il volume rimanente dopo l'uso.
- Preparare etanolo fresco all'80% con acqua priva di RNasi/DNasi il giorno dell'uso. L'etanolo può assorbire acqua dall'aria; questo potrebbe influire sui risultati. Smaltire l'etanolo all'80% dopo l'uso in conformità alle normative locali, nazionali e/o federali. Utilizzare etanolo per biologia molecolare.

Note sulla procedura

Suggerimenti e tecniche

Evitare la contaminazione incrociata

- Quando si aggiungono o si trasferiscono i campioni, cambiare le punte tra un *campione e l'altro*.
- Quando si aggiungono adattatori o primer con una pipetta multicanale, cambiare le punte tra *ogni pozzetto*.
- Sigillare e desigillare con cautela le piastre su un banco per evitare la contaminazione incrociata dei campioni.
- Per evitare la contaminazione, ogni pozzetto indici è monouso.
- Utilizzare i volumi nella vaschetta indicati e non versare nuovamente il volume rimanente dalla vaschetta nelle provette della soluzione madre, in quanto ciò potrebbe causare contaminazione. Il volume è sufficiente per supportare il flusso di lavoro.
- Non raggruppare in pool le librerie di preparazioni diverse.

Precisione del pipettaggio

Quando si utilizzano pipette multicanale, attenersi alle seguenti linee guida:

- Assicurarsi che le punte a barriera siano ben aderenti e appropriate alla marca e al modello della pipetta multicanale.
- Fissare le punte con un movimento rotatorio per garantire che tutte le punte siano ben fissate.
- Aspirare con uguali livelli di volume di liquido in tutte le punte.
- Pipettare lentamente le soluzioni viscosi (BLT-PF,CB,ELM,TWB2).
- Dopo l'erogazione, verificare che il liquido sia stato erogato da ogni punta.

Evitare la formazione di schiuma

- Pipettare lentamente e capovolgere per miscelare. Non miscelare tramite vortex ELM e TWB2.

Manipolazione delle piastre indici

- Perforare la sigillatura in alluminio solo per gli indici che verranno utilizzati.
- Maneggiare la piastra tenendola per i bordi ed evitare di toccare la sigillatura in alluminio con qualcosa di diverso dalle punte per pipette pulite.
- Non riutilizzare i pozzetti perforati.
- Smaltire il volume inutilizzato (~30 µl) dopo l'uso dai pozzetti perforati della piastra indici e porre una sigillatura sui pozzetti perforati per evitare la contaminazione incrociata.
- Non posizionare le sigillature su pozzetti non utilizzati, in quanto ciò interferisce con la perforazione.

Manipolazione delle piastre di preparazione delle librerie

- Sigillare sempre la piastra prima di conservarla, agitarla, incubarla o centrifugarla.
- Per sigillare la piastra, applicare la copertura adesiva alla piastra utilizzando un cuneo o un rullo sigillante.
- Assicurarsi che i bordi e i pozzetti siano completamente sigillati per ridurre il rischio di contaminazione incrociata e di evaporazione.
- Sigillare sempre le piastre con una nuova sigillatura adesiva. Non riutilizzare le sigillature.
- Posizionare la piastra su una superficie piatta prima di rimuovere attentamente la sigillatura.
- Se non diversamente specificato, è possibile eseguire i passaggi con la piastra inserita o rimossa dal magnete.

Trasferimenti delle piastre

- Quando si trasferiscono volumi tra le piastre, trasferire il volume specificato da ogni pozzetto di una piastra di origine al pozzetto corrispondente della piastra di destinazione.

Vaschette

- Ove indicato, è possibile utilizzare vaschette per reagenti. Utilizzare le seguenti linee guida:
 - Preparare la vaschetta con CB dopo la miscelazione tramite vortex. Non è necessario rimettere CB nella provetta e miscelare tramite vortex prima della seconda fase di aggiunta delle microsfere.
 - Etichettare le vaschette TWB2 e RSB per evitare confusione.
 - Smaltire i reagenti quando indicato o alla fine del flusso di lavoro.

- Utilizzare il volume consigliato. I volumi consigliati includono un eccesso di 1 ml per il volume morto nella vaschetta.
- RSB e TWB2 sono confezionati in provette simili. Leggere attentamente ciascuna etichetta prima dell'uso.

Centrifugazione

- Centrifugare solo alle fasi indicate nella procedura per consolidare il liquido o le microsfere nella parte inferiore del pozzetto per evitare la perdita del campione.

Manipolazione delle microsfere

- Non congelare Cleanup Beads (CB).
- Quando si lavano le microsfere:
 - Utilizzare il supporto magnetico Magnetic Stand-96 per tutte le piastre MIDI.
 - Erogare il liquido in modo che nessuna microsfera rimanga aderente sulla parete del pozzetto.
 - Tenere la piastra sul supporto magnetico.
- Aggiungere sempre i reagenti al centro o sul fondo del pozzetto senza smuovere il pellet di microsfere. Non aggiungere reagenti nella parte superiore del pozzetto.
- Pipettare le sospensioni delle microsfere lentamente.
- Miscelare tramite vortex le microsfere fino a quando non sono ben disperse. Il colore del liquido deve apparire omogeneo. Miscelare tramite vortex quando specificato nel protocollo per garantire che le microsfere siano risospese al momento dell'uso.
- Se le microsfere non si risospendono, agitare nuovamente.
- Se le microsfere vengono aspirate nelle punte delle pipette quando non è previsto, dispensare nuovamente le reazioni nella piastra collocata sul supporto magnetico e attendere che il liquido diventi trasparente (2 minuti).
- Conservare in posizione verticale per assicurarsi che le microsfere siano immerse nel tampone quando vengono riportate nel luogo deputato alla conservazione dopo l'uso.

Controlli

TruSight Whole Genome utilizza controlli analitici integrati nel software TruSight Whole Genome Analysis Application per la qualifica dei dati e non richiede l'uso di controlli dei lotti esterni. Consultare [Controlli di qualità a pagina 34](#) per ulteriori informazioni sulle specifiche delle metriche.

Istruzioni per l'uso

Flusso di lavoro di TruSight Whole Genome Dx Library Prep

Il diagramma seguente illustra il flusso di lavoro di TruSight Whole Genome Dx Library Prep. Fra i vari passaggi sono contrassegnati i punti di arresto sicuri.

In caso di arresto, rimettere i reagenti rimanenti nelle provette originali alla temperatura di conservazione indicata in [Reagenti forniti a pagina 6](#). Se si continua, passare alla sezione successiva del protocollo con i reagenti preparati.



Pianificazione dei lotti e Creazione della corsa

Pianificare il numero di librerie di campioni per il lotto e indicizzare e raggruppare in pool per le corse di sequenziamento.

TruSight Whole Genome è stato valutato e le prestazioni sono state dimostrate per quattro serie di indici per la cella a flusso S2 ([Figura 1](#), [Tabella 4](#)) e due serie di indici per la cella a flusso S4 ([Figura 2](#), [Tabella 5](#)). Il software applica l'uso di set di indici specificati. Non miscelare e abbinare diversi set di indici specificati.

Un numero di plex di sequenziamento al di fuori di queste raccomandazioni non è supportato.

I set di indici S2 e indici S4 insieme supportano le dimensioni del lotto di preparazione delle librerie di 6, 12, 16, 18, 22 e 24 campioni. Utilizzare i set di indici compatibili elencati nella [Tabella 3](#) per ogni dimensione del lotto di preparazione delle librerie.

**ATTENZIONE**

Disporre i campioni nella piastra utilizzando un orientamento che corrisponda all'indicizzazione pianificata, ovvero le righe da A a H per un 16 plex o le righe da A a F per un 6 plex. Aggiungere gli indici utilizzando una pipetta multicanale per evitare di saltare un pozzetto o aggiungere due serie di indici a un singolo campione, il che può causare rispettivamente nessun risultato o risultati falsati.

Tabella 3 Opzioni del set di indici per lotto di preparazione delle librerie

Dimensione del lotto di preparazione delle librerie	Set di indici	Configurazioni della cella a flusso
6 campioni	Set di indici S2 1, 2, 3 o 4 (scegliere un set qualsiasi)	S2 x 1
12 campioni	Set di indici S2 1, 2, 3 o 4 (scegliere 2 set qualsiasi)	S2 x 2
18 campioni	Set di indici S2 1, 2, 3 o 4 (scegliere 3 set qualsiasi)	S2 x 3
24 campioni	Set di indici S2 1, 2, 3 e 4	S2 x 4
16 campioni	Set di indici S4 1 o 2	S4 x 1
22 campioni	Set di indici S4 1 + Set di indici S2 3 o 4 Set di indici S4 2 + set di indici S2 1 o 2	S4 x 1 e S2 x 1

Figura 1 Layout della piastra indici che mostra quattro set di indici per il sequenziamento della cella a flusso S2

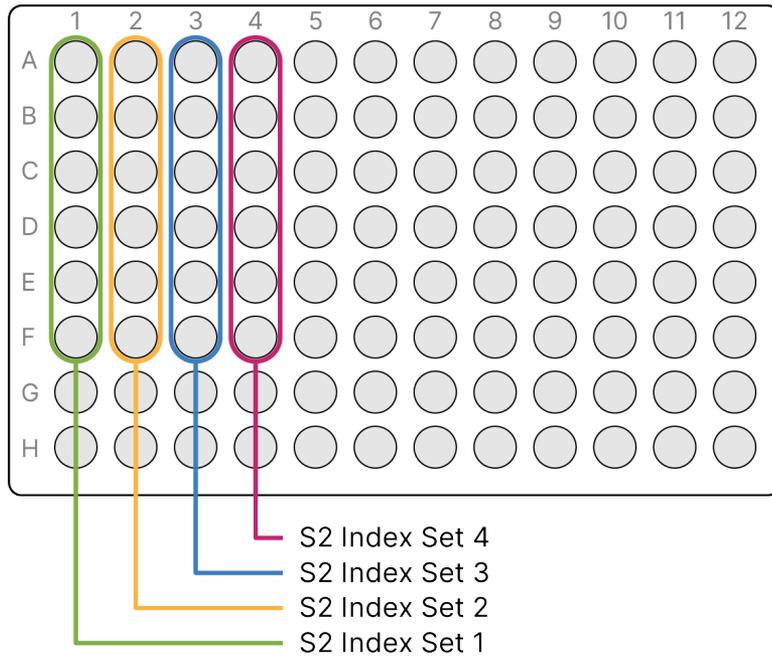


Tabella 4 Set di indici S2 per cella a flusso S2

	Set di indici S2 1 (verde)	Set di indici S2 2 (giallo)	Set di indici S2 3 (blu)	Set di indici S2 4 (magenta)
	1	2	3	4
A	UDP0037	UDP0065	UDP0081	UDP0089
B	UDP0038	UDP0066	UDP0082	UDP0090
C	UDP0039	UDP0067	UDP0083	UDP0091
D	UDP0040	UDP0068	UDP0084	UDP0092
E	UDP0041	UDP0069	UDP0085	UDP0093
F	UDP0042	UDP0070	UDP0086	UDP0094

Figura 2 Layout della piastra indici che mostra due set di indici per il sequenziamento della cella a flusso S4

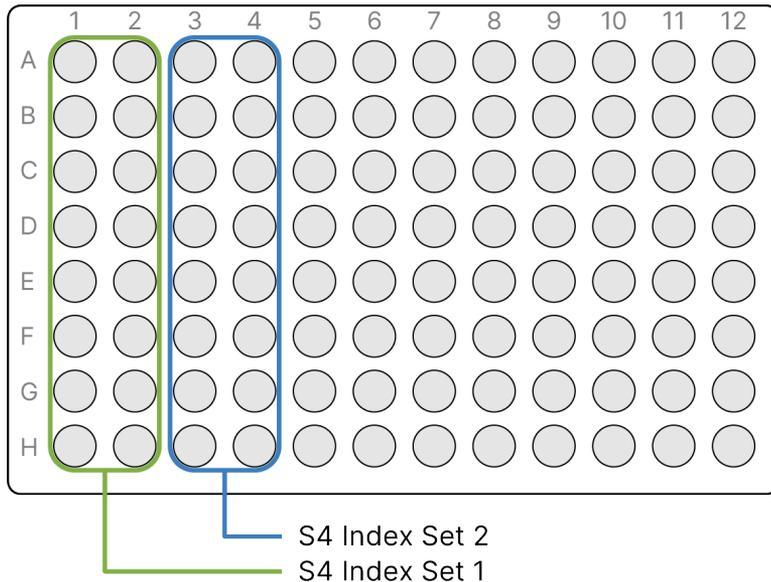


Tabella 5 Set di indici S4 per cella a flusso S4

	Set di indici S4 1 (verde)		Set di indici S4 2 (blu)	
	1	2	3	4
A	UDP0037	UDP0065	UDP0081	UDP0089
B	UDP0038	UDP0066	UDP0082	UDP0090
C	UDP0039	UDP0067	UDP0083	UDP0091
D	UDP0040	UDP0068	UDP0084	UDP0092
E	UDP0041	UDP0069	UDP0085	UDP0093
F	UDP0042	UDP0070	UDP0086	UDP0094
G	UDP0043	UDP0071	UDP0087	UDP0095
H	UDP0044	UDP0072	UDP0088	UDP0096

Registrare il nome univoco del lotto e i dati del campione, tra cui l'ID campione, l'ID pozzetto della piastra indici associata (consultare l'[Appendice A a pagina 84](#)), la piastra della libreria, l'ID pozzetto della piastra della libreria e l'ID della provetta delle librerie (se noto). Queste informazioni vengono immesse durante la creazione della corsa.

Per istruzioni su come usare l'applicazione per creare le corse, consultare Guida TruSight Whole Genome Analysis Application (documento n. 200049931). Registrare il nome della corsa da utilizzare durante il caricamento dei materiali di consumo.

**ATTENZIONE**

Assicurarsi che gli indici e i campioni associati utilizzati durante la preparazione delle librerie corrispondano a quelli registrati e utilizzati per creare una corsa. Le discrepanze possono causare la segnalazione di risultati errati o nessun risultato.

Preparazione del protocollo

Preparazione di reagenti e apparecchiature

Se si prevede di effettuare il sequenziamento lo stesso giorno, scongelare in anticipo i materiali di consumo per il sequenziamento. Consultare Documentazione tecnica per NovaSeq 6000Dx Instrument (n. documento 200010105) per istruzioni dettagliate.

1. Preriscaldare l'incubatore per microcampioni con un inserto per piastre MIDI a 47 °C.
2. Rimuovere i seguenti reagenti dalla scatola e scongelarli come segue.

Tabella 6 Conservazione da -25 °C a -15 °C

Reagente	Nome scatola	Istruzioni di scongelamento
BLT-PF	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Scongelare a temperatura ambiente per 30 minuti.
ELM	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Scongelare a temperatura ambiente per 30 minuti. Quindi, tenere in ghiaccio fino a quando non è necessario.
HP3	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Scongelare a temperatura ambiente per 30 minuti.
TB1	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Scongelare a temperatura ambiente per 30 minuti.
UD Indexes	TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes	Scongelare a temperatura ambiente per 30 minuti.

Tabella 7 Conservazione da 15 °C a 30 °C

Reagente	Nome scatola	Istruzioni di scongelamento
CB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Utilizzare a temperatura ambiente.
RSB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Utilizzare a temperatura ambiente.
ST2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Utilizzare a temperatura ambiente.
TWB2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Utilizzare a temperatura ambiente.
NB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Utilizzare a temperatura ambiente.

**ATTENZIONE**

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

Preparazione dei campioni di DNA

Preparare i seguenti materiali di consumo.

- Campioni di gDNA quantificati:
 - a. Portare a temperatura ambiente.
 - b. Centrifugare brevemente per raccogliere le goccioline.
 - c. Miscelare tramite vortex a impulsi o pipettare per miscelare, quindi centrifugare brevemente.
- RSB—Miscelare tramite vortex o capovolgere per miscelare. Conservare a temperatura ambiente.
 - RSB e TWB2 sono confezionati in provette simili. Leggere attentamente ciascuna etichetta prima dell'uso.

Procedura

A seconda dell'input di DNA, che varia in base al metodo di quantificazione del DNA utilizzato, calcolare i volumi necessari per preparare i campioni di DNA diluiti. Le formule sono fornite di seguito per i tre metodi di quantificazione del DNA testati. Per ulteriori informazioni, consultare le [Raccomandazioni in merito agli input di DNA a pagina 11](#) e l'[Appendice B a pagina 87](#).

I calcoli presuppongono un volume minimo di pipettaggio di 2,0 µl e includono un eccesso del 10%.

L'arrotondamento deve essere eseguito negli ultimi passaggi, dopo aver completato i calcoli, utilizzando il numero richiesto di decimali per garantire un pipettaggio accurato.

Opzione 1: input di DNA 280 ng per metodi di quantificazione ad ampio intervallo Quant e Qubit

La concentrazione minima di soluzione madre di DNA del campione è 11,2 ng/µl. I campioni < 11,2 ng/µl hanno maggiori probabilità di non superare il CQ della libreria dopo il sequenziamento. A seconda della concentrazione dello soluzione madre di DNA, utilizzare una delle seguenti equazioni per eseguire i calcoli.

1. Per la concentrazione di soluzione madre di DNA da 11,2 a 154,0 ng/µl, calcolare il volume di soluzione madre di DNA e RSB necessario utilizzando un volume totale di DNA diluito di 27,5 µl (25 µl più un eccesso del 10%) come costante:

- a. Calcolare il volume di soluzione madre di DNA:

$$\begin{aligned} \text{Volume della soluzione madre di DNA } (\mu\text{l}) &= \frac{(\text{Input del DNA target (ng)} + \text{eccesso del 10\%})}{\text{Concentrazione della soluzione madre di DNA (ng/\mu\text{l})}} \\ &= 280 \text{ ng} \times 1.1 / \text{Concentrazione della soluzione madre di DNA (ng/\mu\text{l})} \\ &= 308 \text{ ng} / \text{Concentrazione della soluzione madre di DNA (ng/\mu\text{l})} \end{aligned}$$

- b. Calcolare il volume di soluzione madre di RSB:

$$\begin{aligned} \text{Volume RSB } (\mu\text{l}) &= \text{Volume totale di DNA diluito } (\mu\text{l}) - \text{Volume soluzione madre di DNA calcolato } (\mu\text{l}) \\ &= 27.5 (\mu\text{l}) - \text{Volume soluzione madre di DNA calcolato } (\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- c. Verificare i calcoli: Confermare il volume di soluzione madre di DNA calcolato (μl) + il volume calcolato di RSB (μl) = 27,5 μl , il volume totale di DNA diluito (una costante, 25 μl più un'eccedenza del 10%).

2. In alternativa, per concentrazioni di soluzione madre di DNA > 154,0 ng/ μl , calcolare il volume totale di DNA diluito e RSB necessario utilizzando il volume di soluzione madre di DNA 2,0 μl e la concentrazione di soluzione madre di DNA diluito target 11,2 ng/ μl come costanti.

- a. Calcolare il volume totale di DNA diluito:

$$\begin{aligned} \text{Volume totale di DNA diluito } (\mu\text{l}) &= \frac{\text{Concentrazione di soluzione madre di DNA (ng/\mu\text{l})} \times \text{Volumi di soluzione madre di DNA } (\mu\text{l})}{\text{Concentrazione di soluzione madre di DNA target diluito}} \\ &= \text{Concentrazione di soluzione madre di DNA (ng/\mu\text{l})} \times 2.0 \mu\text{l} / 11.2 \text{ ng/\mu\text{l}} \end{aligned}$$

- b. Calcolare il volume di RSB:

$$\begin{aligned} \text{Volume RSB } (\mu\text{l}) &= \text{Volume totale calcolato di DNA diluito } (\mu\text{l}) - \text{Volume soluzione madre di DNA } (\mu\text{l}) \\ &= \text{Volume totale calcolato di DNA diluito } (\mu\text{l}) - 2.0 \mu\text{l} \end{aligned}$$

- c. Verificare i calcoli: Confermare il volume totale calcolato di DNA diluito (μl) - il volume calcolato di RSB (μl) = 2,0 μl , il volume di soluzione madre di DNA (una costante).

Procedere al passaggio 3 riportato di seguito.

Opzione 2: input di DNA 350 ng per il metodo di quantificazione Accuclear Ultra High Sensitivity

La concentrazione minima di soluzione madre di DNA del campione è 14,0 ng/ μl . I campioni < 14,0 ng/ μl hanno maggiori probabilità di non superare il CQ della libreria dopo il sequenziamento. A seconda della concentrazione dello soluzione madre di DNA, utilizzare una delle seguenti equazioni per eseguire i calcoli.

1. Per una concentrazione di soluzione madre di DNA compresa tra 14,0 e 192,5 ng/ μl , calcolare il volume di soluzione madre di DNA e RSB necessario utilizzando un volume totale di DNA diluito di 27,5 μl (25 μl più un'eccedenza del 10%) come costante:

- a. Calcolare il volume di soluzione madre di DNA:

$$\begin{aligned} \text{Volume della soluzione madre di DNA } (\mu\text{l}) &= \frac{(\text{Input del DNA target (ng)} + \text{eccesso del 10\%})}{\text{Concentrazione della soluzione madre di DNA (ng/\mu\text{l})}} \\ &= 350 \text{ ng} \times 1.1 / \text{Concentrazione della soluzione madre di DNA (ng/\mu\text{l})} \\ &= 385 \text{ ng} / \text{Concentrazione della soluzione madre di DNA (ng/\mu\text{l})} \end{aligned}$$

- b. Calcolare il volume di soluzione madre di RSB:

$$\begin{aligned} \text{Volume RSB } (\mu\text{l}) &= \text{Volume totale di DNA diluito } (\mu\text{l}) - \text{Volume soluzione madre di DNA calcolato } (\mu\text{l}) \\ &= 27.5 (\mu\text{l}) - \text{Volume soluzione madre di DNA calcolato } (\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- c. Verificare i calcoli: Confermare il volume di soluzione madre di DNA calcolato (μl) + il volume calcolato di RSB (μl) = 27,5 μl , il volume totale di DNA diluito (una costante, 25 μl più un'eccedenza del 10%).

2. In alternativa, per concentrazioni di soluzione madre di DNA > 192,5 ng/ μl , calcolare il volume totale di DNA diluito e RSB necessario utilizzando il volume di soluzione madre di DNA 2,0 μl come costante.

- a. Calcolare il volume totale di DNA diluito:

$$\text{Volume totale di DNA diluito } (\mu\text{l}) = \frac{\text{Concentrazione di soluzione madre di DNA (ng/\mu l)} \times 2.0 \mu\text{l}}{14.0 \text{ ng/\mu l}}$$

- b. Calcolare il volume di RSB:

$$\begin{aligned} \text{Volume RSB } (\mu\text{l}) &= \text{Volume totale di DNA diluito } (\mu\text{l}) - \text{Volume soluzione madre di DNA } (\mu\text{l}) \\ &= \text{Volume totale } (\mu\text{l}) - 2.0 \mu\text{l} \end{aligned}$$

- c. Verificare i calcoli: Confermare il volume totale calcolato di DNA diluito (μl) - il volume calcolato di RSB (μl) = 2,0 μl , il volume di soluzione madre di DNA (una costante).

3. Etichettare una nuova provetta per microcentrifuga da 0,5 ml per ciascun campione diluito.
4. Aggiungere il volume di RSB sopra calcolato alla rispettiva provetta per ciascun campione diluito.
5. Aggiungere il volume di soluzione madre di DNA sopra calcolato alla rispettiva provetta per ciascun campione diluito.
6. Miscelare tramite vortex a impulsi, quindi centrifugare brevemente.

Preparazione delle librerie

Utilizzare le fasi di preparazione descritte in questa sezione per preparare i reagenti in anticipo.

Se non viene specificato un punto di arresto, passare immediatamente alla fase successiva.

Preparazione

Preparare i seguenti materiali di consumo:

- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free)—Miscelare tramite vortex. Se si utilizzano più provette, miscelare tramite vortex, quindi combinarle.
- TB1 (Tagmentation Buffer 1):
 - a. Miscelare tramite vortex.
 - b. Centrifugare brevemente.
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2):
 - a. Verificare la presenza di precipitazione. Se si osservano precipitati, riscaldare a 37 °C per 10 minuti, quindi miscelare tramite vortex fino alla dissoluzione dei precipitati.

- b. Miscelare accuratamente tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- ELM (Extension Ligation Mix):
 - a. Capovolgere per miscelare. Non utilizzare un vortex.
 - b. Conservare con ghiaccio fino al momento dell'uso.
- HP3 (2N NaOH):
 - a. Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - b. Conservare a temperatura ambiente.
- NB (Neutralization Buffer):
 - a. Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - b. Conservare a temperatura ambiente.
- CB (Cleanup Beads):
 - a. Miscelare tramite vortex per 1 minuto.
 - b. Capovolgere 2-5 volte, quindi miscelare accuratamente tramite vortex per risospendere.
- Adattatori indici (UDI PCR-Free (32 Indexes)):
 - a. Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - b. Conservare a temperatura ambiente.
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2):
 - a. Etichettare il tappo della provetta TWB2.
 - b. Capovolgere accuratamente per miscelare.
- In una provetta per microcentrifuga etichettata 0,2N di NaOH, combinare i seguenti volumi per preparare 0,2N di NaOH in base alle dimensioni del lotto previste. Miscelare tramite vortex.

NOTA Se si prevede di raggruppare in pool e denaturare le librerie nello stesso giorno, preparare ulteriori 0,2N di NaOH. Consultare [Preparazione a pagina 30](#).

Reagente	6 campioni (µl)	12 campioni (µl)	16 campioni (µl)	18 campioni (µl)	22 campioni (µl)	24 campioni (µl)
HP3	30	60	80	90	110	120
RSB	270	540	720	810	990	1.080

- In una provetta conica da 15 ml, combinare i seguenti volumi per preparare EtOH all'80% secondo la dimensione del lotto prevista. È inclusa l'eccedenza per l'utilizzo nella vaschetta. Miscelare tramite vortex.

Reagente	6 campioni (ml)	12 campioni (ml)	16 campioni (ml)	18 campioni (ml)	22 campioni (ml)	24 campioni (ml)
100% etanolo, puro (200 proof)	4	8	8	12	12	12
Acqua priva di nucleasi	1	2	2	3	3	3



ATTENZIONE

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

Tagmentazione di DNA genomico

In questa fase, Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF) viene usato per la tagmentazione del DNA, un processo che frammenta e marca il DNA con sequenze adattatore.

Materiali di consumo

- Piastra MIDI a 96 pozzetti
- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free)
- Tagmentation Buffer 1 (TB1)
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)

Procedura

1. Verificare che l'incubatore per microcampioni con l'inserito della piastra MIDI sia preriscaldato a 47 °C.
2. Apporre un'etichetta "LP1" (Library Plate 1) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
3. Designare e registrare gli ID dei pozzetti dei campioni per la tagmentazione dei campioni di DNA e dei reagenti diluiti.
4. Trasferire 25 µl di DNA del campione diluito in ciascun pozzetto.
5. Aggiungere 10 µl di TB1 a ciascun pozzetto.
6. Agitare BLT-PF vigorosamente tramite vortex per 1 minuto per risospendere. Non centrifugare. Ripetere se necessario.
7. Aggiungere 15 µl di BLT-PF a ciascun pozzetto.
8. Sigillare e agitare LP1 a 1.800 giri/min per 1 minuto.

9. Incubare LP1 nell'incubatore per microcampioni preriscaldato a 47 °C per 8 minuti.

NOTA È prevista la formazione di una leggera condensa sulla sigillatura della piastra. Non centrifugare.

10. Rimuovere la sigillatura e aggiungere 10 µl di ST2 a ciascun pozzetto.
11. Sigillare e agitare LP1 a 1.800 giri/min per 1 minuto, quindi passare alla fase successiva.

Pulizia in seguito alla tagmentazione

I passaggi seguenti eliminano il DNA non legato ed eseguono lo scambio del tampone per prepararsi alla fase successiva.

Materiali di consumo

- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2)
- Vaschetta

Informazioni sui reagenti

- Pipettare TWB2 lentamente per ridurre al minimo la formazione di schiuma.
- RSB e TWB2 sono confezionati in provette simili. Leggere attentamente ciascuna etichetta prima dell'uso.

Procedura

1. Rimuovere la sigillatura e posizionare LP1 sul supporto magnetico e attendere che il liquido diventi trasparente (2 minuti).
2. Preparare la vaschetta di TWB2 con i volumi in base alla tabella seguente ed etichettare chiaramente la vaschetta TWB2. I volumi includono un eccesso di 1 ml per il volume morto nella vaschetta. Conservare la vaschetta per i passaggi successivi.

Reagente	6 campioni (µl)	12 campioni (µl)	16 campioni (µl)	18 campioni (µl)	22 campioni (µl)	24 campioni (µl)
TWB2	3.700	6.400	8.200	9.100	10.900	11.800

3. Con LP1 sul supporto magnetico, usare una pipetta multicanale impostata su 60 µl per rimuovere ed eliminare il surnatante da ogni pozzetto senza smuovere il pellet di microsferi.
4. Utilizzando una pipetta multicanale, aggiungere 150 µl di TWB2 a ciascun pozzetto.
5. Sigillare e agitare LP1 a 1.800 giri/min per 1 minuto.
6. Rimuovere la sigillatura e posizionare LP1 sul supporto magnetico e attendere che il liquido diventi trasparente (2 minuti).
7. Rimettere BLT-PF nel luogo di conservazione congelata durante l'incubazione, quindi procedere alla fase successiva.

Indici di legatura

In questa sezione gli utenti legano gli adattatori a doppio indice univoci a ciascun campione in base all'indicizzazione pianificata durante la [Pianificazione dei lotti e Creazione della corsa a pagina 16](#).

Materiali di consumo

- ELM (Extension Ligation Mix)
- Adattatori indici (UDI PCR-Free (32 Indexes))
- Vaschetta TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2)
- 0,2N di NaOH (HP3 diluito)

Informazioni sui reagenti

- I pozzetti della piastra indici non possono essere riutilizzati.
- Aspirare e dispensare ELM lentamente poiché la soluzione è viscosa.
- RSB e TWB2 sono confezionati in provette simili. Leggere attentamente ciascuna etichetta prima dell'uso.

Procedura

1. Tenere LP1 sul supporto magnetico e completare i seguenti passaggi:
 - a. Utilizzare una pipetta multicanale impostata su 150 µl per rimuovere ed eliminare il surnatante da ogni pozzetto.
 - b. Senza smuovere il pellet di microsferi, utilizzare una pipetta da 20 µl per rimuovere ed eliminare TWB2 residuo da ogni pozzetto.
 - c. Aggiungere 45 µl di ELM a ciascun pozzetto.
 - d. Perforare la sigillatura in alluminio sulla piastra adattatore indici per ciascuno dei pozzetti indice pianificati utilizzando una pipetta multicanale P200 e nuove punte per pipette. Per evitare la contaminazione, utilizzare una nuova punta per pipetta per ciascun pozzetto.
 - e. Aggiungere adattatori indici da 5 µl ai pozzetti dei campioni corrispondenti di LP1 in base agli indici selezionati durante la pianificazione dei lotti utilizzando una pipetta multicanale P-10 o P-20.
2. Sigillare e agitare LP1 a 1.800 giri/min per 1 minuto.
3. Incubare LP1 nell'incubatore per microcampioni preriscaldato a 47 °C per 8 minuti.

NOTA È prevista la formazione di una leggera condensa sulla sigillatura della piastra. Non centrifugare.

4. Riportare ELM nel luogo deputato alla conservazione congelata durante l'incubazione, quindi procedere alla fase successiva.
5. Rimuovere la sigillatura e posizionare LP1 sul supporto magnetico e attendere che il liquido diventi trasparente (2 minuti).

6. Con LP1 sul supporto magnetico, usare una pipetta multicanale impostata su 50 µl per rimuovere ed eliminare il surnatante da ogni pozzetto senza smuovere il pellet di microsfere.
7. Lavare le microsfere come descritto di seguito.
 - a. Aggiungere 150 µl TWB2 alle microsfere in ciascun pozzetto utilizzando una pipetta multicanale.
 - b. Sigillare e agitare LP1 a 1.800 giri/min per 1 minuto.
 - c. Rimuovere la sigillatura e posizionare LP1 sul supporto magnetico e attendere che il liquido diventi trasparente (2 minuti).
 - d. Con LP1 sul supporto magnetico, usare una pipetta multicanale impostata su 150 µl per rimuovere ed eliminare il surnatante da ogni pozzetto senza smuovere il pellet di microsfere.
8. Lavare le microsfere una **seconda** volta.
9. Con LP1 sul supporto magnetico, usare una pipetta multicanale impostata su 20 µl per rimuovere ed eliminare TWB2 residuo da ogni pozzetto senza smuovere il pellet di microsfere.
10. Aggiungere 45 µl di 0,2N di NaOH preparato in precedenza a ciascun pozzetto.
11. Sigillare e agitare LP1 a 1.800 giri/min per 1 minuto, quindi passare alla sezione successiva.

Selezione delle dimensioni e pulizia delle librerie

Questa fase utilizza una selezione delle dimensioni bilaterale delle librerie. Nella prima fase, le Cleanup Beads vengono aggiunte alle librerie eluite e alle microsfere BLT-PF. Quindi il surnatante contenente la libreria eluita a singolo filamento viene trasferito in una nuova piastra mentre i frammenti troppo grandi vengono tralasciati. Nella seconda fase, le Cleanup Beads vengono aggiunte alle librerie trasferite e i frammenti troppo piccoli vengono rimossi. Quindi, le librerie vengono eluite e trasferite alla piastra libreria finale (FLP).

Materiali di consumo

- Piastra MIDI a 96 pozzetti
- Vaschette (3)
- Piastra PCR
- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Etanolo all'80% (EtOH 80%) preparato al momento

Preparazione

1. Miscelare CB tramite vortex, poi capovolgere fino a completa risospensione.
2. Preparare la vaschetta CB con i volumi in base alla seguente tabella ed etichettare il contenitore CB. I volumi sono sufficienti per entrambe le fasi di aggiunta e includono un eccesso di 1 ml nella vaschetta per il volume morto della vaschetta. Non è necessario miscelare tra le fasi di aggiunta di CB. Le microsfere rimarranno disperse per tutta la durata della procedura.

Reagente	6 campioni (µl)	12 campioni (µl)	16 campioni (µl)	18 campioni (µl)	22 campioni (µl)	24 campioni (µl)
CB	1.480	1.960	2.280	2.440	2.760	2.920

Procedura

1. Rimuovere la sigillatura e aggiungere 40 µl CB ai pozzetti della piastra LP1 MIDI contenente BLT-PF e 0,2N di NaOH.
2. Sigillare e agitare LP1 a 1.800 giri/min per 1 minuto.
3. Incubare LP1 lontano dal supporto magnetico a temperatura ambiente per 2 minuti.
4. Rimuovere la sigillatura e posizionare LP1 sul supporto magnetico e attendere che il liquido diventi trasparente (5 minuti).
5. Mentre la piastra viene incubata, etichettare una nuova piastra MIDI LP2 a 96 pozzetti.
6. *Trasferire* 80 µl di surnatante da LP1 mentre si trova sul supporto magnetico ai pozzetti corrispondenti di LP2 utilizzando una pipetta multicanale.
7. Aggiungere 40 µl di CB a ciascun pozzetto della piastra MIDI.
8. Sigillare e agitare LP2 a 1.800 giri/min per 1 minuto.
9. Eliminare la piastra LP1 MIDI.
10. Incubare LP2 lontano dal supporto magnetico a temperatura ambiente per 2 minuti.
11. Rimuovere la sigillatura e posizionare LP2 sul supporto magnetico e attendere che il liquido diventi trasparente (5 minuti).
12. Con LP2 sul supporto magnetico, usare una pipetta multicanale impostata su 120 µl per rimuovere ed eliminare il surnatante da ogni pozzetto senza smuovere il pellet di microsfere.
13. Versare EtOH all'80% precedentemente preparato in una vaschetta etichettata e lavare le microsfere con LP2 sul magnete come segue.
 - a. Aggiungere 180 µl di EtOH all'80% utilizzando una pipetta multicanale.
 - b. Attendere 30 secondi.
 - c. Usare una pipetta multicanale impostata su 180 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza smuovere il pellet di microsfere.
14. Lavare le microsfere una **seconda** volta.
15. Con LP2 sul supporto magnetico, utilizzare una pipetta multicanale impostata su 20 µl per rimuovere ed eliminare l'EtOH residuo da ciascun pozzetto senza smuovere il pellet di microsfere.
16. Tenere LP2 sul supporto magnetico per 4 minuti per asciugare all'aria.
17. Eliminare l'EtOH all'80% e la vaschetta inutilizzati.
18. Preparare la vaschetta di RSB con i volumi secondo la seguente tabella ed etichettare la vaschetta RSB. I volumi includono un eccesso di 1 ml per il volume morto nella vaschetta.

Reagente	6 campioni (µl)	12 campioni (µl)	16 campioni (µl)	18 campioni (µl)	22 campioni (µl)	24 campioni (µl)
RSB	1.390	1.780	2.040	2.170	2.430	2.560

19. Aggiungere 65 µl RSB alle microsfere in ciascun pozzetto.
20. Sigillare e agitare LP2 a 1.800 giri/min per 1 minuto.
21. Incubare LP2 a temperatura ambiente per 2 minuti.
22. Rimuovere la sigillatura e posizionare LP2 sul supporto magnetico e attendere che il liquido diventi trasparente (2 minuti).
23. Etichettare una nuova piastra PCR "FLP" (Final Library Plate) e con il nome del lotto utilizzato durante la creazione della corsa.
24. *Trasferire* 60 µl di surnatante da LP2 mentre si trova sul supporto magnetico ai pozzetti corrispondenti di FLP utilizzando una pipetta multicanale.

**ATTENZIONE**

Il surnatante contiene la libreria finale e sarà utilizzato durante la fase di raggruppamento in pool e denaturazione. Non eliminare.

25. Eliminare tutte le vaschette insieme ai reagenti non utilizzati nelle vaschette.
26. Eliminare la piastra LP2 MIDI.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

In caso di arresto, sigillare la piastra libreria finale (FLP) con Microseal B e conservarla a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 14 giorni.

Raggruppamento in pool e denaturazione delle librerie

In questa sezione gli utenti creano pool pianificati in [Pianificazione dei lotti e Creazione della corsa a pagina 16](#) e diluiscono e denaturano.

Materiali di consumo

- HP3 (2N NaOH) o 0,2N di NaOH se preparato lo stesso giorno, miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- NB (Neutralization Buffer)—Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- RSB (Resuspension Buffer)—Miscelare tramite vortex o capovolgere per miscelare.
- Provette per microcentrifuga (1 per la preparazione dei reagenti e 1 per ciascun pool di librerie pianificato)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube (PN 20062290 o PN 20062291) (1 provetta per ciascun pool di librerie pianificato)

Preparazione

1. Combinare i volumi seguenti in una provetta per microcentrifuga per preparare 0,2N di NaOH. Etichettare la provetta 0,2N di NaOH. Se durante la preparazione delle librerie sono stati preparati ulteriori 0,2N di NaOH e il protocollo viene eseguito lo stesso giorno, saltare questo passaggio.

Per evitare piccoli errori di pipettaggio, viene preparato un volume aggiuntivo.

Reagente	Volume per ogni cella a flusso S2 (µl)	Volume per ogni cella a flusso S4 (µl)
HP3	5	10
RSB	45	90

- Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.

Procedura

- Se la piastra FLP è stata conservata congelata, prepararla come segue. Altrimenti, passare al punto 2.
Piastra FLP:
 - Scongellare a temperatura ambiente per 30 minuti.
 - Centrifugare a 1.000 × g per 1 minuto.
 - Rimuovere la sigillatura dalla FLP.
 - Miscelare con una pipetta da 5 a 10 volte, utilizzando una pipetta multicanale impostata su 30 µl.
 - Sigillare e centrifugare a 1.000 × g per 1 minuto.
- Selezionare una delle seguenti opzioni per raggruppare in pool, denaturare e diluire le librerie per ciascuna serie di 6 o 16 campioni pianificati per il sequenziamento.

Opzione 1 Sequenziare 6 librerie sulla cella a flusso S2.

- Per ogni pool di librerie, etichettare una nuova provetta per microcentrifuga con il nome del pool, ad esempio librerie raggruppate in pool (PL) 1, 2, 3, ecc.
- Rimuovere la sigillatura e trasferire 25 µl di ciascuna libreria di DNA con codice a barre da un determinato set di indici S2 dalla piastra FLP alla provetta PL per ciascuna corsa pianificata corrispondente in base ai pool di sequenziamento pianificati durante [Pianificazione dei lotti e Creazione della corsa a pagina 16](#). Ad esempio, combinare le librerie preparate utilizzando il set di indici S2 1 nella provetta PL.
- Applicare la sigillatura adesiva alla piastra FLP e riportarla nel luogo deputato alla conservazione.
- Aggiungere 37 µl 0,2N di NaOH a ciascuna provetta PL.
- Miscelare tramite vortex ciascuna provetta PL. Centrifugare brevemente.
- Incubare ogni provetta PL a temperatura ambiente per 8 minuti.
- Aggiungere 38 µl di NB a ciascuna provetta PL.
- Miscelare tramite vortex ciascuna provetta PL. Centrifugare brevemente.
- Trasferire 225 µl di libreria denaturata e diluita in una provetta della libreria NovaSeq 6000Dx pulita.

**ATTENZIONE**

Se specificato in precedenza, l'ID della provetta della libreria NovaSeq 6000Dx verrà utilizzato per identificare e associare la corsa pianificata. Assicurarsi che l'ID della provetta della libreria in cui il pool viene trasferito sia lo stesso ID della provetta della libreria specificato in Create Run (Crea corsa), altrimenti potrebbe verificarsi un'associazione errata dei risultati del campione. Se l'ID della provetta della libreria è specificato nella corsa pianificata, confermare che sia utilizzata la provetta corretta. Se non specificato in precedenza, registrare l'ID della provetta della libreria utilizzato e controllare la corsa pianificata, altrimenti una o più corse pianificate dovranno essere selezionate manualmente quando si carica lo strumento utilizzando il nome della corsa.

Opzione 2 Sequenziare 16 librerie sulla cella a flusso S4.

- a. Etichettare una nuova provetta per microcentrifuga con il nome del pool, ad esempio librerie raggruppate in pool (PL) 1, 2, 3, ecc.
- b. Rimuovere la sigillatura e trasferire 18 µl di ciascuna libreria di DNA dalla piastra FLP alla provetta PL in base al pool di sequenziamento pianificato durante la [Pianificazione dei lotti e Creazione della corsa a pagina 16](#). Ad esempio, combinare le librerie utilizzando il set di indici S4 1 nella provetta PL.
- c. Applicare la sigillatura adesiva alla piastra FLP e riportarla nel luogo deputato alla conservazione.
- d. Aggiungere 22 µl di RSB alla provetta PL.
- e. Aggiungere 77 µl 0,2N di NaOH alla provetta PL.
- f. Miscelare tramite vortex la provetta PL. Centrifugare brevemente.
- g. Incubare a temperatura ambiente la provetta PL per 8 minuti.
- h. Aggiungere 78 µl di tampone NB alla provetta PL.
- i. Miscelare tramite vortex la provetta PL. Centrifugare brevemente.
- j. Trasferire 465 µl di libreria denaturata e diluita in una provetta della libreria NovaSeq 6000Dx pulita.

**ATTENZIONE**

Se specificato in precedenza, l'ID della provetta della libreria NovaSeq 6000Dx verrà utilizzato per identificare e associare la corsa pianificata. Assicurarsi che l'ID della provetta della libreria in cui il pool viene trasferito sia lo stesso ID della provetta della libreria specificato in Create Run (Crea corsa), altrimenti potrebbe verificarsi un'associazione errata dei risultati del campione. Se l'ID della provetta della libreria è specificato nella corsa pianificata, confermare che sia utilizzata la provetta corretta. Se non specificato in precedenza, registrare l'ID della provetta della libreria utilizzato e controllare la corsa pianificata, altrimenti una o più corse pianificate dovranno essere selezionate manualmente quando si carica lo strumento utilizzando il nome della corsa.

3. Procedere direttamente al sequenziamento se si prevede di iniziare la corsa lo stesso giorno.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Nel caso si esegua un arresto, tappare la provetta della libreria NovaSeq 6000Dx e conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 30 giorni.

Preparazione per il sequenziamento

1. Seguire le istruzioni di preparazione nella Documentazione tecnica per NovaSeq 6000Dx Instrument (n. documento 200010105) per i materiali di consumo nel kit pianificato per il sequenziamento.
2. Se la provetta della libreria NovaSeq 6000Dx contenente la libreria raggruppata in pool è stata conservata congelata, prepararla come segue. Se si procede direttamente dalla sezione precedente, passare a [3](#).
 - a. Scongelare a temperatura ambiente per 30 minuti.
 - b. Rimuovere il tappo e pipettare delicatamente la miscela cinque volte utilizzando una pipetta P1000 impostata su 300 µl per il pool di librerie della cella a flusso S4 o una pipetta P200 impostata su 145 µl per il pool di librerie della cella a flusso S2.
 - c. Tappare la provetta della libreria NovaSeq 6000Dx e scuotere manualmente eventuali goccioline verso il fondo. Non agitare tramite vortex o centrifugare.
3. Caricamento dei materiali di consumo. Consultare Documentazione tecnica per NovaSeq 6000Dx Instrument (n. documento 200010105) per i dettagli.

Interpretazione dei risultati

TruSight Whole Genome è disegnato per sequenziare l'intero genoma umano. Le varianti sono riportate per i campioni che superano i controlli di qualità (CQ) analitici per l'uso con applicazioni germline di analisi terziaria a valle.

- Un risultato di sequenziamento, FASTQ o di qualità del campione è considerato valido solo se il parametro di qualità soddisfa o supera la specifica definita. Se la metrica di qualità è inferiore alla specifica definita, le prestazioni saranno riportate come NON SUPERATO e il campione deve essere ripetuto. Per informazioni sulle specifiche delle metriche di qualità utilizzate per determinare la validità del campione, consultare [Controlli di qualità a pagina 34](#).
- Si prevede che i campioni che superano tutte le soglie di qualità forniscano le prestazioni di identificazione delle varianti descritte nello studio di precisione (consultare [Accuratezza a pagina 44](#)).
- Le varianti piccole sono annotate con affidabilità alta, intermedia o bassa in base alle prestazioni previste di ciascun tipo di variante (consultare [Determinazione del livello di affidabilità delle varianti piccole a pagina 39](#)).
- L'interpretazione di tutte le informazioni sulle varianti deve essere convalidata dal laboratorio utilizzando i file di output dell'analisi forniti. Consultare Guida TruSight Whole Genome Analysis Application (documento n. 200049931) per una descrizione delle informazioni fornite nei file di output.

Controlli di qualità

La validità della corsa di sequenziamento e del campione viene determinata automaticamente utilizzando controlli analitici ed è riportata dall'TruSight Whole Genome Analysis Application (per ulteriori dettagli sulle specifiche delle metriche del controllo di qualità, consultare la [Tabella 8](#)). TruSight Whole Genome non richiede l'uso di controlli positivi esterni.

- I risultati del CQ sono riportati in un report consolidato, per tutti i campioni in una corsa e in report del CQ dei singoli campioni. I report vengono inviati dal software alla cartella di analisi. Consultare Guida TruSight Whole Genome Analysis Application (documento n. 200049931) per la posizione della cartella di analisi e della cartella della corsa.
- Il mancato superamento della specifica del controllo di qualità della corsa di sequenziamento invalida la corsa di sequenziamento e interrompe l'analisi aggiuntiva.
- Il mancato superamento di qualsiasi specifica FASTQ o libreria dei campioni invalida la libreria dei campioni e impedisce l'output dei file CRAM o VCF associati.
- Ulteriori misure di controllo qualità possono applicarsi in conformità alle normative locali, statali e/o federali o ai requisiti di accreditamento.

Per maggiori informazioni sulla ripetizione di corse di sequenziamento o sulla preparazione delle librerie, consultare [Risoluzione dei problemi a pagina 69](#).

Tabella 8 Descrizioni delle specifiche metriche del controllo di qualità di TruSight Whole Genome

	Metrica	Specifica	Descrizione
CQ della corsa di sequenziamento	% totale \geq Q30	≥ 85	Misura della qualità delle basi a livello della corsa. La specifica minima è impostata perché cicli %Q30 troppo bassi non supereranno le basi Q30 nel CQ delle librerie di campioni.
CQ FASTQ	Resa per campione (bps)	$\geq 90.000.000.000$	Il valore minimo è impostato per essere equivalente a una copertura autosomica media $\sim 26x$ per lo smistamento dei campioni che non supereranno il CQ della libreria per ridurre il tempo di analisi.

	Metrica	Specifica	Descrizione
CQ campioni libreria	Copertura autosomica media	≥ 35	Copertura media tra gli autosomi. La specifica minima è impostata per garantire le prestazioni analitiche.
	Percentuale di autosomi con copertura superiore a 20X	$\geq 93,94$	Misura dell'uniformità di copertura che rileva problemi non necessariamente correlati alla distorsione GC. La specifica minima è impostata per garantire le prestazioni analitiche.
	Copertura normalizzata dal 60% al 79% degli intervalli GC	$0,82 \leq x \leq 1,13$	Misura dell'uniformità di copertura che rileva la distorsione GC, in particolare una perdita di copertura in aree del genoma con %GC più elevata e %AT più bassa di composizione delle basi. Le specifiche minime e massime sono impostate per garantire le prestazioni analitiche.
	Copertura normalizzata dal 20% al 39% degli intervalli GC	$0,97 \leq x \leq 1,06$	Misura dell'uniformità di copertura che rileva la distorsione GC, in particolare una perdita di copertura in aree del genoma con %GC inferiore e %AT superiore di composizione delle basi. Le specifiche minime e massime sono impostate per garantire le prestazioni analitiche.
	Copertura mitocondriale media	≥ 500	Copertura del cromosoma mitocondriale. La specifica minima è impostata per garantire il limite di rilevamento delle SNV mitocondriali.
	Percentuale basi Q30	≥ 85	Misura della qualità delle basi. La specifica minima è impostata per garantire le prestazioni analitiche.
	Contaminazione stimata del campione	$\leq 0,005$	Rileva letture contaminanti da altri campioni. La specifica massima è impostata per garantire il limite di rilevamento delle SNV mitocondriali (il tipo di variante con la massima sensibilità alla contaminazione).

Caratteristiche delle prestazioni

I seguenti studi di convalida sono stati eseguiti utilizzando il flusso di lavoro TruSight Whole Genome descritto nelle [Istruzioni per l'uso a pagina 16](#) e sono stati disegnati per garantire la robustezza del saggio rispetto alle fonti di variazione comuni e per fornire raccomandazioni per prestazioni coerenti. Questi studi hanno utilizzato le specifiche metriche del CQ analitico descritte nella [Tabella 8](#) come parametro di riferimento per la riuscita delle prestazioni del saggio e come prerequisito per stabilire le prestazioni di identificazione delle varianti analitiche.

Contaminazione incrociata

Lo studio sulla contaminazione incrociata ha valutato il rilevamento errato di Index Read (Lettura degli indici) a causa della contaminazione da pozzetto a pozzetto durante la preparazione delle librerie dei campioni e la contaminazione da ciclo a ciclo tra cicli di sequenziamento consecutivi. Sono stati utilizzati 24 campioni di sangue per valutare la contaminazione incrociata. Sono state preparate 24 librerie in totale da due operatori utilizzando i set di indici di configurazione S2 1-4, e le librerie raggruppate in pool sono state sequenziate in ordine di set di indici su un NovaSeq 6000Dx Instrument. Sono state preparate 16 librerie per ciascuno da due operatori usando i set di indici di configurazione S4 1 e 2 in due replicati, e le librerie raggruppate in pool con set di indici alternati sono state sequenziate sullo stesso NovaSeq 6000Dx.

Per valutare la contaminazione incrociata, sono state confrontate le letture degli indici corrette con le letture degli indici dei pozzetti adiacenti per la contaminazione da pozzetto a pozzetto e la precedente corsa di sequenziamento per la contaminazione da ciclo a ciclo. La quantità di contaminazione da ciclo a ciclo era $\leq 0,003178\%$ per S2 e $\leq 0,002487\%$ per le corse S4. Per valutare la contaminazione da campione a campione, è stata utilizzata la metrica di CQ della libreria campioni per la contaminazione stimata del campione. La quantità di contaminazione da campione a campione era 0,001, il valore più basso riportato dal software di analisi. Questi risultati indicano un basso rischio di contaminazione all'interno dei flussi di lavoro di preparazione e sequenziamento delle librerie.

Stabilità durante l'uso e intermedia

I reagenti per la preparazione delle librerie sono stati valutati per la stabilità durante l'uso del kit, compresi molteplici eventi di congelamento-scongelo e stabilità delle provette aperte.

Per i test del ciclo di congelamento-scongelo, i componenti congelati sono stati sottoposti a cinque eventi di congelamento-scongelo a supporto di un evento per il disimballaggio e di quattro eventi per l'uso del kit. Per la stabilità durante l'uso, il volume necessario per preparare sei librerie di campioni è stato rimosso in ciascuno dei tre cicli di congelamento-scongelo per simulare la deplezione del volume durante l'uso e i componenti sono stati conservati per altri 31 giorni prima del test. Dopo l'analisi con gDNA estratto da sei donatori di sangue, tutti i dati hanno superato le metriche di controllo analitiche del saggio. Questi risultati indicano che i reagenti per la preparazione delle librerie congelate possono essere utilizzati con un massimo di quattro cicli di congelamento-scongelo e una stabilità durante l'uso di 30 giorni.

La stabilità intermedia è stata valutata per le singole librerie e le librerie raggruppate e denaturate. Tutti i dati hanno superato le metriche di controllo analitico del saggio che indicano una stabilità fino a 14 giorni per le singole librerie e una stabilità fino a 30 giorni per le librerie raggruppate in pool e denaturate quando conservate congelate (da -25 °C a -15 °C) come descritto nei punti di arresto di sicurezza.

Prelievo e conservazione dei campioni di sangue

La compatibilità delle provette per il prelievo di sangue e la conservazione dei campioni sono state esaminate utilizzando quattro donatori e il sangue prelevato in provette di prelievo con EDTA di tre diversi fornitori. Il DNA genomico (gDNA) è stato estratto da ciascuno all'arrivo per il tempo zero e in seguito nuovamente dopo che il sangue è stato conservato per 16, 33 e 43 giorni di stoccaggio a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C. Il gDNA estratto è stato conservato congelato (da -25 °C a -15 °C) nel tampone di eluizione (10 mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0) e in seguito quantificato e usato per la preparazione e il sequenziamento della libreria. Tutti i dati hanno superato le metriche di controllo analitiche del saggio che indicano la compatibilità del saggio con tre diverse provette per il prelievo di sangue con EDTA e il sangue conservato fino a cinque settimane a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

Valutazione del metodo di estrazione del DNA

Sono stati valutati tre kit di estrazione disponibili in commercio per le prestazioni del saggio. Due kit hanno utilizzato microsfere magnetiche, uno con e uno senza fase solida e legame a base di cellulosa, e un kit ha utilizzato un metodo di purificazione degli acidi nucleici a base di membrana di silice usando colonne di rotazione (Tabella 9).

La valutazione è stata eseguita da due operatori con un lotto di reagenti di estrazione per metodo e sangue intero raccolto in provette con EDTA da quattro donatori presumibilmente sani. Ogni campione di sangue è stato estratto quattro volte separatamente secondo le istruzioni del produttore in giorni non consecutivi per 16 osservazioni totali per kit. Il gDNA estratto è stato utilizzato per preparare le librerie per il sequenziamento e l'analisi.

Tutte le osservazioni (16/16) per ciascun metodo di estrazione hanno superato le metriche di controllo analitico del saggio. Le prestazioni del saggio non sono state influenzate dalla scelta del metodo di estrazione del gDNA del campione. Gli studi di accuratezza analitica e riproducibilità hanno utilizzato gDNA estratto con il Kit 3 (isolamento delle colonne del filtro in silice con colonne di rotazione).

Tabella 9 Metodi di estrazione testati per le prestazioni di TruSight Whole Genome

Kit	Metodo di estrazione
1	Estrazione di microsfere magnetiche con immobilizzazione reversibile in fase solida (SPRI)
2	Estrazione di microsfere magnetiche con fase solida mobile e legame a base di cellulosa
3	Isolamento in colonne a filtro in silice con colonne di rotazione

Sensibilità dell'input di DNA

La quantità di input del gDNA raccomandata per l'analisi per campione è di 280 ng o 350 ng a seconda dei metodi di quantificazione del DNA elencati nelle [Raccomandazioni in merito agli input di DNA a pagina 11](#).

Per determinare le prestazioni in un intervallo di concentrazioni di input del gDNA, la quantità di DNA utilizzata nel saggio è stata testata a livelli che vanno da $\pm 28,6\%$ all'input raccomandato. I risultati hanno dimostrato che il -25% dell'input di gDNA raccomandato è un limite inferiore per il saggio. Il saggio funziona in modo appropriato con un input del gDNA fino a $+28,6\%$ dell'input raccomandato.

La caratterizzazione di tre diversi metodi di quantificazione ha dimostrato che diversi metodi hanno diversi livelli di variabilità e possono produrre risultati dissimili. Se si utilizza un metodo diverso da quelli elencati nelle [Raccomandazioni in merito agli input di DNA a pagina 11](#), potrebbe essere necessario ottimizzare l'input del gDNA target. Si raccomanda di quantificare insieme i gDNA per i campioni destinati a un particolare lotto di preparazione delle librerie e a un'analisi di sequenziamento per eliminare la variabilità da lotto a lotto, ove possibile, oppure di utilizzare controlli di processo per garantire una variabilità da lotto a lotto $\leq 25\%$ della quantificazione del gDNA.

Sostanze interferenti

Questo studio ha valutato le prestazioni con sostanze endogene ed esogene associate al sangue umano e alle provette per il prelievo di sangue umano. Bilirubina, emoglobina e trigliceridi sono stati selezionati per la valutazione per simulare campioni itterici, emolizzati e lipemici, rispettivamente. Biotina ed EDTA sono stati selezionati per la valutazione a causa della presenza nel sangue e nelle provette per il prelievo di sangue (BCT) e per il potenziale impatto sulla chimica del saggio. Le sostanze sono state aggiunte nei campioni di sangue del donatore prima dell'estrazione direttamente o dopo la dissoluzione in solvente. La concentrazione del test e i dettagli dell'aggiunta per ciascuna sostanza sono riportati nella seguente tabella.

Tabella 10 Sostanze interferenti testate per le prestazioni di TruSight Whole Genome

Sostanza	Concentrazione del test	Solvente utilizzato nella soluzione di aggiunta	% di aggiunta al sangue
Bilirubina (non coniugata)	40 mg/dl (0,4 mg/ml) ¹	DMSO	4%
Emoglobina	1.000 mg/dl (10 mg/ml) ¹	NA – Dissolto nel sangue	NA – Dissolto nel sangue
Trigliceridi	1.500 mg/dl (15 mg/ml) ¹	Etanolo al 100%	4%
Biotina	0,00351 mg/ml ²	Acqua	4%
EDTA	5,4 mg/ml ³	Acqua	3%

¹ Le concentrazioni sono state scelte come le concentrazioni più alte osservate secondo le "Supplemental Tables for Interference Testing in Clinical Chemistry, CLSI EP37-ED1:2018".

² La concentrazione è stata scelta per essere tre volte la "Concentrazione massima di farmaco durante un trattamento terapeutico" indicata in "Supplemental Tables for Interference Testing in Clinical Chemistry, CLSI EP37-ED1:2018".

³ La concentrazione è stata scelta in base alla concentrazione di EDTA che varia nelle provette per il prelievo di sangue fino a 1,8 mg/ml e per simulare un evento di sottoriempimento, è stato effettuato un prelievo di sangue pari al 33% del volume nominale del BCT, che ha portato a una concentrazione di EDTA nel sangue 3 volte superiore, corrispondente a 5,4 mg/ml.

Per i test è stato utilizzato il sangue di quattro donatori. Per ciascuna sostanza interferente, un'aliquota di sangue intero di ciascun donatore è stata addizionata con l'interferente e in seguito suddivisa tra quattro replicati di estrazione del gDNA. Un controllo è stato trattato in modo simile senza aggiunta di sostanze. Le condizioni di test e controllo appaiate sono state elaborate per ciascun donatore nello stesso evento di estrazione e il gDNA estratto è stato quindi elaborato nell'ambito di un singolo evento di preparazione e sequenziamento della libreria. Non è stato osservato alcun impatto sulle prestazioni del saggio e nessuna evidenza di interferenza in risposta a una qualsiasi delle sostanze testate.

Equivalenza indicizzazione campioni

TruSight Whole Genome fornisce una scelta tra quattro set di indici a 6-plex per le corse S2 o due set di indici a 16-plex per le configurazioni delle corse di sequenziamento S4. È stato dimostrato che il saggio fornisce prestazioni equivalenti quando le librerie sono sequenziate sulle configurazioni della corsa di sequenziamento S2 o S4 di NovaSeq 6000Dx. Inoltre, entrambe le configurazioni della corsa S2 e S4 hanno dimostrato di ottenere > 95% delle librerie di campioni con una copertura minima di 35,0x quando testate con i set di indici prescritti. In questo modo, i diversi set di indici e il raggruppamento in pool utilizzati per il sequenziamento sulle celle a flusso S2 e S4 possono essere utilizzati in modo intercambiabile, per offrire la scalabilità necessaria a compensare le fluttuazioni della resa dei campioni e la flessibilità dei processi di laboratorio.

Prestazioni analitiche

Sono stati condotti studi di caratterizzazione iniziali per determinare le soglie del livello di affidabilità per le varianti piccole, il limite di bianco/limite di rilevamento per le SNV mitocondriali e le soglie dimensionali per il rilevamento accurato delle espansioni delle STR quando si utilizza il flusso di lavoro di TruSight Whole Genome. I campioni che rappresentano le classi di varianti valutate da TruSight Whole Genome sono stati inclusi nella valutazione dell'accuratezza analitica e della ripetibilità, compresa la precisione intra-laboratorio e la riproducibilità esterna. Le prestazioni analitiche sono riportate per le corse di sequenziamento e i campioni che hanno superato tutti i controlli di qualità, ad eccezione dei campioni di miscele artificiali utilizzati per valutare le SNV mitocondriali in corrispondenza o in prossimità del limite di rilevamento che non ha superato la metrica di contaminazione. I risultati di ciascuno di questi studi sono descritti nelle sezioni seguenti.

Studi iniziali di caratterizzazione

Determinazione del livello di affidabilità delle varianti piccole

Per questo studio, è stato addestrato un modello di regressione logistica su siti di varianti altamente riproducibili e scarsamente riproducibili da 96 replicati di NA12878 per definire le soglie per livelli di affidabilità alti, medi e bassi.

Le basi ad alta affidabilità per un dato tipo di variante sono quelle in cui la riproducibilità intra-laboratorio prevista soddisfa o supera il 99% per una data soglia di punteggio e la percentuale di basi non-N che soddisfano tale criterio supera il 30%. Se un tipo di variante piccola non ha una soglia di punteggio che soddisfa questi criteri, quel tipo di variante non avrà un livello di affidabilità elevato. Le basi ad affidabilità intermedia sono quelle in cui la riproducibilità intra-laboratorio prevista soddisfa o supera il 95% per una data soglia di punteggio e tipo di variante. Le basi a bassa affidabilità sono quelle in cui la riproducibilità intra-laboratorio prevista è inferiore al 95% per una data soglia di punteggio e tipo di variante. Le identificazioni delle varianti per un particolare tipo di variante con un livello di affidabilità alto o intermedio includono la maggior parte delle basi %non-N (ovvero, escluse le lacune) (consultare la Tabella 6) e dimostrano prestazioni elevate quando valutate rispetto a piccole serie veritiere di varianti e in ampie valutazioni della precisione intra-laboratorio dei replicati di NA12878.

Tipo di variante	Livello di affidabilità	% basi non-N
SNV	Alto	89,14%
	Intermedio	3,30%
	Basso	7,56%
Delezioni brevi (1-5 bp)	Alto	90,88%
	Intermedio	2,45%
	Basso	6,67%
Delezioni intermedie (6-15 bp)	Intermedio	86,94%
	Basso	13,06%
Delezioni lunghe (≥ 16 bp)	Intermedio	85,42%
	Basso	14,58%
Inserzioni brevi (1-5 bp)	Alto	88,94%
	Intermedio	4,61%
	Basso	6,45%
Inserzioni intermedie (6-15 bp)	Intermedio	89,37%
	Basso	10,63%
Inserzioni lunghe (≥ 16 bp)	Intermedio	48,92%
	Basso	50,63%

Determinazione limite del bianco/limite di rilevamento delle varianti a singolo nucleotide (SNV) mitocondriali

Sono stati condotti studi sul limite del bianco (LoB) e sul limite di rilevamento (LoD) per le SNV mitocondriali. Per lo studio delle SNV mitocondriali, il LoB è stato valutato utilizzando loci noti per non avere alcuna variante (ovvero identificazione di riferimento). Il LoD è definito come la frequenza allelica della variante SNV del mtDNA per la quale il tasso di rilevamento di tale variante è del 95%.

Per determinare il LoB e il LoD per il rilevamento delle mtSNV eteroplasmatiche, campioni di gDNA accuratamente caratterizzati provenienti da due diversi donatori di sangue sono stati miscelati in uno studio di titolazione a cinque livelli di diluizione con 20 replicati per livello di diluizione. I livelli di diluizione sono stati disegnati per mirare alle percentuali delle varianti mtSNV (1,2 - 6% VAF) per simulare vari livelli di eteroplasmia mitocondriale. Sono stati elaborati campioni misti di gDNA e le letture sono state sottocampionate per ottenere una copertura mitocondriale media 500x. Nella valutazione a valle sono stati utilizzati in totale 42 siti "eteroplasmatici" artificiali. È stata utilizzata un'analisi di regressione per stimare i rapporti di miscelazione richiesti per mirare a 1x LoD e 2x LoD per un sottogruppo di mtSNV.

Le posizioni in cui il gDNA di entrambi i campioni di sangue presenta genotipi degli alleli di riferimento sono state valutate per le identificazioni delle mtSNV che hanno superato il filtro con un allele non di riferimento. Il tasso di falsi positivi è stato calcolato allo 0,8%, coerentemente con un'ipotesi di zero-LoB in base a "Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures, CLSI EP17-A2-ED1:2012". Ciascuna delle 42 posizioni è stata analizzata in modo indipendente utilizzando la regressione probit. Il valore LoD è stato definito come il valore VAF previsto corrispondente al tasso di rilevamento del 95% (C95). Il valore LoD complessivo riportato, definito come il 95° percentile dei valori LoD provenienti dai siti veritieri, era il 4,75% della VAF. La media della distribuzione delle differenze assolute tra la VAF osservata e quella prevista per tutte le osservazioni è stata calcolata allo 0,83% con un limite di affidabilità superiore al 95% dello 0,86% della VAF.

Determinazione della soglia di espansione delle STR

A causa delle limitazioni tecniche dell'estensione delle STR che superano la lunghezza di lettura del sequenziamento (~135 bp), la lunghezza delle STR osservata con TruSight Whole Genome sarà spesso una sottostima della lunghezza reale. Una volta che la lunghezza effettiva delle STR supera la lunghezza mediana del frammento (~330 bp), la lunghezza delle STR stima i plateau. Per questo motivo, TruSight Whole Genome valuta un insieme mirato di loci per i quali il saggio può discriminare accuratamente le STR con lunghezze osservate entro la variazione normale rispetto a quelle con lunghezze superiori a quelle osservate in una popolazione presumibilmente sana ("espansa") (consultare [Tabella 2](#) per l'elenco dei loci valutati mediante TruSight Whole Genome).

Per garantire una percentuale di concordanza negativa (NPA) aggregata del 95% in tutti i siti delle STR valutati da TruSight Whole Genome, sono state impostate soglie in base ai loci per identificare una STR espansa in quel sito per raggiungere una media di NPA del 99,94% per sito. Per tenere conto della variabilità intrinseca nelle stime delle dimensioni delle STR all'interno di una popolazione presumibilmente sana, sono state stabilite delle soglie in base alla distribuzione delle lunghezze delle STR osservate in modo indipendente nel set di dati del 1000 Genomes Project presumibilmente sani (2.504 campioni da varie popolazioni trattati con DRAGEN 3.7.5 ed ExpansionHunter 4.0.2).⁴

Per confermare le soglie stabilite utilizzando il set di dati del 1000 Genomes Project, il gDNA estratto da 16 campioni di riferimento della linea cellulare (Center for Disease Control's Genetic Testing Reference Material (Get-RM) Program) con una varietà di dimensioni delle STR stimate in modo indipendente è stato elaborato con TruSight Whole Genome. Dieci replicati delle librerie per ciascuno dei 16 campioni sono stati preparati e testati da sei operatori per un totale di 960 osservazioni, e le dimensioni delle STR sono state stimate in modo indipendente per ciascun replicato. Il tasso di falsi positivi a livello di campione osservato in tutti i loci target era dello 0,35%.

Il limite di rilevamento (LoD) è stato stimato per i 28 loci delle STR target con le linee cellulari testate in base alle dimensioni degli alleli osservate con TruSight Whole Genome e alle dimensioni degli alleli previste in base alla precedente caratterizzazione indipendente (Tabella 11). Per i loci selezionati, è stato determinato un limite di rilevamento per più di una STR nello stesso sito per un totale di 35 STR. Il LoD è la dimensione stimata alla quale viene rilevata l'espansione delle STR prevista per il 95% degli alleli in base a un modello probit con le soglie confermate per distinguere le dimensioni delle STR normali ed espanse. I dati in tutti i siti con dimensioni degli alleli note sono stati raggruppati in pool per ottenere stime del LoD per ogni sito in base alla soglia specifica del sito per una STR espansa. La lunghezza della ripetizione di FMR1 è stata sistematicamente sottostimata rispetto ad altre STR e ha richiesto un modello personalizzato per stimare correttamente il LoD.

Le soglie specifiche per sito confermate per le STR espanse, il LoD stimato previsto e osservato per i siti target e la soglia della malattia in base alla letteratura disponibile (solo a scopo illustrativo) dei siti delle STR target sono riportati nella Tabella 11. Per espansioni delle STR più lunghe della soglia dettata dalla lunghezza della lettura e per le quali la lunghezza prevista non può essere osservata direttamente, una lunghezza osservata si avvicina a una lunghezza media che verrebbe osservata in diverse corse di sequenziamento. Per espansioni delle STR più brevi della soglia dettata dalla lunghezza della lettura, le lunghezze previste e osservate sono le stesse.

Tabella 11 Riepilogo della capacità di rilevamento stimata per i siti delle STR target di TruSight Whole Genome

Locus target ^a	Soglia delle STR espanse (bp) in base al set di dati del 1000 Genomes Project	LoD stimato (lunghezza prevista, bp)	LoD stimato (lunghezza osservata, bp)	Soglia della malattia (lunghezza reale, bp) ^b
AFF2	168	266	221	600 ⁵
AR	114	115	115	114 ⁶
ATN1	90	92	92	135 ^{7,8}
ATXN1	114	115	115	114 ^{7,8}
ATXN10	200	298	233	3.995 ^{7,8}
ATXN2	102	102	102	105 ^{7,8}
ATXN3	135	189	182	180 ^{7,8}
ATXN7	60	60	60	111 ^{7,8}
ATXN7_GCC	93	101	101	NA
ATXN8OS	200	298	233	237 ^{7,8}

Locus target ^a	Soglia delle STR espanse (bp) in base al set di dati del 1000 Genomes Project	LoD stimato (lunghezza prevista, bp)	LoD stimato (lunghezza osservata, bp)	Soglia della malattia (lunghezza reale, bp) ^b
ATXN8OS_CTA	90	92	92	NA
C9ORF72 ^c	200	298	233	360 ^{9,10}
CACNA1A	57	57	57	60 ^{7,8}
CBL	171	281	227	243 ⁵
CNBP	192	308	237	300 ^{5,11}
CNBP_CA	102	102	102	NA
CNBP_CAGA	68	80	80	NA
CSTB	200	298	233	348 ^{12,13}
DIP2B	200	298	233	NA
DMPK	122	132	142	150 ¹⁴
FMR1	175	433	212	600 ^{d,15}
FXN	102	102	102	198 ^{6,16}
FXN_A	200	298	233	NA
GLS	111	115	115	270 ¹⁷
HTT	108	115	115	120 ¹⁸
HTT_CCG	42	42	42	NA
JPH3	99	101	101	123 ¹⁹
NIPA1	33	33	33	NA
NOP56	84	84	84	3900 ^{20,21}
NOP56_CGCCTG	24	24	24	NA
NOTCH2NL	129	175	174	213 ^{22,23}
PABPN1	27	27	27	NA
PHOX2B	60	60	60	75 ^{5,24}
PPP2R2B	87	90	90	198 ^{7,8}
TBP	129	175	174	135 ^{7,8}

^a I loci con STR alternate sono annotati da LOCI_<ALTERNATE_REPEAT> (per es, ATXN7_GCC).

^b Le soglie della malattia fornite solo a scopo illustrativo sulla base della letteratura pubblicata; NA (non applicabile) in questa colonna indica che la STR potrebbe non essere associata a un'espansione patogena pubblicata.

^c Il 100% dei replicati di NA23378 ha rilevato un'espansione delle STR in C9ORF72, indicativa di un'espansione precedentemente non caratterizzata in quel sito in quel campione. Questo campione di linea cellulare è stato escluso dall'analisi.

^d Anche le espansioni intermedie possono essere associate a un fenotipo.

Questo studio ha dimostrato profili di precisione e accuratezza simili per le stime delle dimensioni delle STR in diversi loci target, con il limite di rilevamento per le espansioni delle STR in gran parte guidato dalla soglia selezionata (in base alla distribuzione delle dimensioni nella popolazione del 1000 Genomes Project) piuttosto che dalle differenze nella capacità di rilevamento tra i siti. Tutti i valori LoD stimati nella scala di lunghezza prevista erano superiori alle lunghezze osservate in popolazioni presumibilmente sane e inferiori a molte soglie di malattia pubblicate, rendendo le soglie di identificazione dell'espansione delle STR associate utili per contrassegnare la ripetizione in un particolare locus come potenzialmente espansa. Le soglie qui riportate sono state utilizzate per valutare l'accuratezza del rilevamento dell'espansione delle STR.

Accuratezza

L'accuratezza analitica è stata determinata confrontando le identificazioni delle varianti di TruSight Whole Genome con i risultati ottenuti utilizzando metodi alternativi. I metodi di riferimento sono stati scelti in base a una differenza considerevole rispetto a TruSight Whole Genome, che utilizza la preparazione delle librerie legata alle microsfere Nextera™, la chimica di sequenziamento a 2 coloranti su NovaSeq 6000Dx e DRAGEN 3.9.5 per l'identificazione delle varianti. È stato condotto un approccio rappresentativo alla convalida di TruSight Whole Genome con campioni che rappresentano varianti in tutte le classi di varianti incluse nell'output del saggio. Un totale di 459 campioni unici che hanno superato il CQ analitico sono stati utilizzati per valutare l'accuratezza di TruSight Whole Genome. I campioni sono stati testati su tre lotti di reagenti e materiali di consumo per la preparazione delle librerie, quattro lotti di kit di sequenziamento S4, otto operatori, cinque NovaSeq 6000Dx Instrument e due siti interni. Sono stati preparati e sequenziati 31 pool di librerie indipendenti. La tabella seguente fornisce le definizioni delle metriche calcolate negli studi di accuratezza.

Termine	Definizione
Livello di confidenza inferiore (LCL)	Limite di confidenza unilaterale inferiore del 95% utilizzando il metodo di Wilson.
Percentuale di concordanza negativa (NPA) ¹	Percentuale di siti negativi come definito dal metodo di riferimento che sono identificati concordemente come negativi con TruSight Whole Genome.
Percentuale di concordanza positiva (PPA) ²	Percentuale di varianti identificate nel metodo di riferimento che sono identificazioni in modo concordante con TruSight Whole Genome.
Valore predittivo positivo tecnico (TPPV) ³	Percentuale di varianti identificate con TruSight Whole Genome che sono identificate in modo concordante nel metodo di riferimento.

¹ Per la precisione di rilevamento dell'espansione delle STR e la precisione di rilevamento degli alleli SMN1, NPA = Vero negativo / (Vero negativo + Falso positivo).

² Per la precisione di rilevamento dell'espansione delle STR e la precisione di rilevamento degli alleli SMN1, PPA = Vero positivo / (Vero positivo + Falso negativo).

³ Per la precisione del rilevamento dell'espansione delle STR e della precisione del rilevamento degli alleli SMN1, TPPV = Vero positivo / (Vero positivo + Falso positivo).

Precisione delle varianti piccole

L'accuratezza delle identificazioni delle varianti piccole è stata valutata utilizzando DNA genomico estratto da sangue intero periferico di 195 donatori presumibilmente sani. Le identificazioni delle varianti di TruSight Whole Genome sono state confrontate con le identificazioni delle varianti da un test di sequenziamento dell'intero genoma convalidato a livello clinico eseguito presso il laboratorio CLIA Laboratory Services (ILS) Illumina come metodo di riferimento. Il flusso di lavoro del sequenziamento dell'intero genoma del metodo di riferimento utilizza una preparazione delle librerie TruSeq™ senza PCR basata sulla legatura, una chimica di sequenziamento a 4 coloranti sul sistema di sequenziamento HiSeq™ e DRAGEN 3.8.4 per l'identificazione delle varianti. Inserzioni e delezioni di dimensioni > 31 bp non sono state caratterizzate in questo studio perché non sono state convalidate nel metodo di riferimento.

Un riepilogo dell'accuratezza per tutte le identificazioni di varianti piccole è mostrato nella [Tabella 12](#) e nella [Tabella 13](#).

Tabella 12 Precisione di TruSight Whole Genome Assay per le varianti piccole stratificate per livello di affidabilità e dimensioni (campioni di sangue presumibilmente sano)

Sottotipo di variante	Livello di affidabilità	Identificazioni conformi al metodo di riferimento	Identificazioni esclusive del metodo di riferimento	Identificazioni conformi al saggio	Identificazioni esclusive del saggio	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV	Alto	261.728.580	1.573.877	261.603.149	208.639	99,4% (99,4%)	99,9% (99,9%)
	Intermedio	6.677.589	421.718	6.519.811	151.128	94,1% (94,0%)	97,7% (97,7%)
	Basso	6.864.840	3.251.709	6.649.756	2.151.388	67,9% (67,8%)	75,6% (75,5%)
Delezione breve (1-5 bp)	Alto	11.978.745	201.783	12.246.922	67.277	98,3% (98,3%)	99,5% (99,5%)
	Intermedio	2.875.258	45.290	3.050.170	47.593	98,4% (98,4%)	98,5% (98,5%)
	Basso	1.802.544	228.582	1.966.974	221.449	88,7% (88,7%)	89,9% (89,8%)
Delezione media (6-15 bp)	Intermedio	858.673	20.079	860.493	18.361	97,7% (97,7%)	97,9% (97,9%)
	Basso	145.618	28.300	157.398	41.824	83,7% (83,6%)	79,0% (78,9%)

Sottotipo di variante	Livello di affidabilità	Identificazioni conformi al metodo di riferimento	Identificazioni esclusive del metodo di riferimento	Identificazioni conformi al saggio	Identificazioni esclusive del saggio	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Delezione lunga (16-31 bp)	Intermedio	344.168	14.334	336.976	31.165	96,0% (95,9%)	91,5% (91,5%)
	Basso	54.444	23.438	53.835	47.272	69,9% (69,6%)	53,2% (53,0%)
Inserzione breve (1-5 bp)	Alto	11.212.366	164.651	11.380.307	49.776	98,6% (98,5%)	99,6% (99,6%)
	Intermedio	1.015.324	41.890	988.512	36.051	96,0% (96,0%)	96,5% (96,5%)
	Basso	639.663	198.700	576.797	180.458	76,3% (76,2%)	76,2% (76,1%)
Inserzione media (6-15 bp)	Intermedio	790.968	18.163	798.572	17.111	97,8% (97,7%)	97,9% (97,9%)
	Basso	76.105	24.188	88.389	35.819	75,9% (75,7%)	71,2% (71,0%)
Inserzione lunga (16-31 bp)	Intermedio	159.927	3.135	159.432	8.639	98,1% (98,0%)	94,9% (94,8%)
	Basso	102.552	22.199	103.892	55.724	82,2% (82,0%)	65,1% (64,9%)

Tabella 13 Riepilogo della NPA di TruSight Whole Genome delle identificazioni delle varianti piccole stratificate per livello di affidabilità

Livello di affidabilità	Identificazioni conformi negative	Metodo di riferimento Identificazioni esclusive negative	NPA (LCL)
Alto	202.276.243.790	127.465.816	99,9% (99,9%)
Intermedio	3.307.740.675	77.650.177	97,7% (97,7%)
Basso	3.653.569.580	439.038.662	89,3% (89,3%)

È stato condotto uno studio di accuratezza supplementare per valutare il rilevamento delle varianti piccole con campioni di DNA di linee cellulari di riferimento disponibili in commercio (Coriell Institute for Medical Research) con set di identificazioni ben caratterizzati generati dal consorzio Genome in a Bottle (GIAB). Per questo studio, i set di identificazione di GIAB sono stati utilizzati come metodo di riferimento. La serie veritiera in questi campioni include inserzioni e delezioni superiori a 31 bp, quindi in questa valutazione sono state incluse inserzioni e delezioni più grandi. Questi campioni includevano HG001-005 e NA24695 con i risultati mostrati in aggregato nella [Tabella 14](#).

Tabella 14 Precisione di TruSight Whole Genome Assay per le varianti piccole stratificate per livello di affidabilità e dimensioni (campioni di linee cellulari ben caratterizzati)

Sottotipo di variante	Livello di affidabilità	Identificazioni conformi a GIAB	Identificazioni esclusive di GIAB	Identificazioni conformi al saggio	Identificazioni esclusive del saggio	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV	Alto	21.431.369	2.552	21.439.303	3,954	> 99,9% (> 99,9%)	> 99,9% (> 99,9%)
	Intermedio	908.172	1.259	910.058	2.175	99,9% (99,9%)	99,8% (99,8%)
	Basso	720.717	59.691	722.180	28.721	92,4% (92,3%)	96,2% (96,1%)
Delezione breve (1-5 bp)	Alto	1.080.383	690	1.090.370	730	99,9% (99,9%)	99,9% (99,9%)
	Intermedio	423.547	788	437.019	606	99,8% (99,8%)	99,9% (99,9%)
	Basso	263.828	2.624	281.217	2.088	99,0% (99,0%)	99,3% (99,2%)
Delezione media (6-15 bp)	Intermedio	142.671	238	144.997	167	99,8% (99,8%)	99,9% (99,9%)
	Basso	86.174	812	91.710	546	99,1% (99,0%)	99,4% (99,4%)
Delezione lunga (≥ 16 bp)	Intermedio	34.414	315	34.580	55	99,1% (99,0%)	99,8% (99,8%)
	Basso	9.985	393	10.212	106	96,2% (95,9%)	99,0% (98,8%)
Inserzione breve (1-5 bp)	Alto	927.288	221	925.787	271	> 99,9% (> 99,9%)	> 99,9% (> 99,9%)
	Intermedio	158.346	294	137.081	250	99,8% (99,8%)	99,8% (99,8%)
	Basso	93.857	2.402	75.687	1.427	97,5% (97,4%)	98,1% (98,1%)
Inserzione media (6-15 bp)	Intermedio	91.117	116	89.054	60	99,9% (99,9%)	99,9% (99,9%)
	Basso	37.925	745	36.670	406	98,1% (98,0%)	98,9% (98,8%)

Sottotipo di variante	Livello di affidabilità	Identificazioni conformi a GIAB	Identificazioni esclusive di GIAB	Identificazioni conformi al saggio	Identificazioni esclusive del saggio	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Inserzione lunga (≥ 16 bp)	Intermedio	11.081	46	11.110	17	99,6% (99,5%)	99,8% (99,8%)
	Basso	14.086	607	14.312	262	95,9% (95,6%)	98,2% (98,0%)

Precisione delle varianti del numero di copie

L'accuratezza delle identificazioni delle CNV è stata valutata utilizzando lo stesso metodo di riferimento e campioni di donatori di sangue presumibilmente sani (195) utilizzati per valutare l'accuratezza delle identificazioni di varianti piccole. Ogni CNV è considerata rilevata nel set di identificazioni se almeno il 50% di tale CNV è coperto dall'unione di identificazioni delle CNV dello stesso tipo (GUADAGNO/PERDITA) nel set di identificazioni abbinato. TruSight Whole Genome definisce un set di regioni genomiche che sono escluse dall'identificazione delle CNV in base a una valutazione dei dati dei campioni di 1000 Genomes e 77 donatori di sangue presumibilmente sani utilizzando metriche relative agli outlier di profondità della copertura, agli outlier di varianza della copertura e alle lacune nella copertura per accertare regioni del genoma non segnalabili per le CNV. L'identificazione delle CNV è stata valutata solo su regioni genomiche comuni sia al metodo di riferimento sia a TruSight Whole Genome. Un riepilogo dell'accuratezza di tutte le identificazioni delle CNV è riportato nella [Tabella 15](#) e nella [Tabella 16](#).

Tabella 15 Precisione delle CNV stratificate per dimensione e tipo di TruSight Whole Genome Assay

Dimensioni	Tipo	Identificazioni conformi al metodo di riferimento	Identificazioni esclusive del metodo di riferimento	Identificazioni conformi al saggio	Identificazioni esclusive del saggio	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
10-25 kbp	GUADAGNO	443	98	342	56	81,89% (79,01%)	85,93% (82,82%)
	PERDITA	4.162	457	4.155	679	90,11% (89,36%)	85,95% (85,11%)
25-50 kbp	GUADAGNO	355	117	370	76	75,21% (71,81%)	82,96% (79,83%)
	PERDITA	1.587	16	1.622	7	99,00% (98,50%)	99,57% (99,21%)

Dimensioni	Tipo	Identificazio ni conformi al metodo di riferimento	Identificazio ni esclusive del metodo di riferimento	Identificazio ni conformi al saggio	Identificazio ni esclusive del saggio	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
50-100 kbp	GUADAGN O	228	0	187	20	> 99,9 9% (98,8 3%)	90,34% (86,4 2%)
	PERDITA	723	5	697	6	99,31% (98,6 0%)	99,15% (98,3 6%)
≥ 100 kbp	GUADAGN O	371	1	335	5	99,73% (98,8 0%)	98,53% (97,0 1%)
	PERDITA	541	23	569	1	95,92% (94,3 2%)	99,82% (99,2 2%)
Complessivamen te (tutte le CNV ≥ 10 kbp)	GUADAGN O	1.397	216	1.234	157	86,61% (85,15%)	88,71% (87,2 4%)
	PERDITA	7.013	501	7.043	693	93,33% (92,8 4%)	91,04% (90,4 9%)

Tabella 16 Riepilogo della NPA di TruSight Whole Genome delle identificazioni delle CNV

Dimensioni	Tipo	Identificazioni conformi negative	Identificazioni negative esclusive del metodo di riferimento	Identificazioni esclusive del saggio	NPA (LCL)
Complessivamente (tutte le CNV ≥ 10 kbp)	GUADAGNO	548.478.033.220	5.701.311	6.400.382	> 99,99% (> 99,99%)
	PERDITA	548.591.794.675	11.719.913	8.543.877	> 99,99% (> 99,99%)

Corse di precisione dell'omozigosi

Il valore predittivo positivo tecnico (TPPV) per le identificazioni delle ROH è stato valutato utilizzando lo stesso metodo di riferimento e campioni di donatori di sangue presumibilmente sani (195) che sono stati utilizzati nelle valutazioni di accuratezza della variante piccola e della CNV. Gli eventi di ROH sono stati determinati

identificando regioni nel genoma contenenti una sequenza di identificazioni SNV omozigoti prive di SNV eterozigoti o lunghe lacune senza varianti. Tali regioni di seeding sono state successivamente estese a sinistra e a destra e valutate per le identificazioni omozigoti circostanti o la presenza di SNV eterozigoti. Gli eventi di ROH rilevati da TruSight Whole Genome sono stati confrontati con le identificazioni delle SNV dal metodo di riferimento. Un riepilogo del TPPV per le identificazioni delle ROH è mostrato nella [Tabella 17](#).

Tabella 17 Precisione di TruSight Whole Genome per gli eventi di ROH stratificati per dimensione

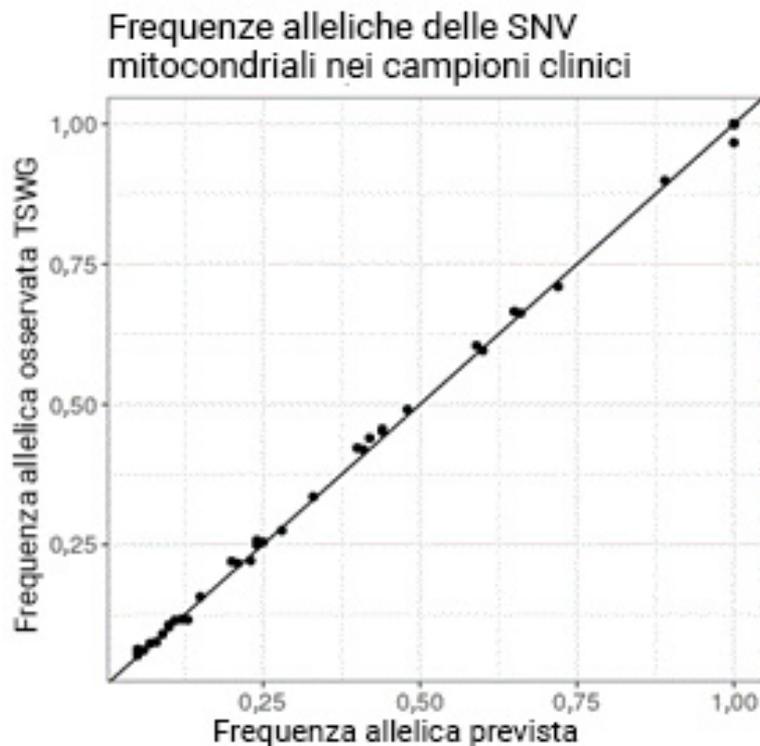
Dimensioni	Media TPPV	TPPV LCL
10-25 kbp	81,44%	80,77%
25-50 kbp	82,14%	81,82%
50-100 kbp	81,77%	81,55%
100-500 kbp	82,19%	81,98%
≥10 kbp	82,07%	81,94%
≥500 kbp	85,47%	84,66%

La concordanza percentuale positiva (PPA) per il rilevamento delle ROH è stata determinata in campioni clinici di provenienza esterna confrontando le identificazioni di TruSight Whole Genome alle identificazioni delle ROH da metodi ortogonali, tra cui microarray cromosomico e valutazione basata su PCR. Un evento di ROH è stato considerato rilevato se almeno il 50% della regione riportata come ROH mediante il metodo ortogonale si sovrapponeva all'unione degli eventi ROH identificati da TruSight Whole Genome. La PPA tra TruSight Whole Genome Assay e i metodi ortogonali era di 34/34 (100%) per tutti gli eventi di ROH attesi (≥ 4 Mb).

Precisione delle SNV mitocondriali eteroplasmatiche

La precisione delle identificazioni delle mtSNV è stata valutata in 41 campioni clinici precedentemente conservati in biobanca provenienti da centri esterni. Ogni campione clinico conteneva una mtSNV precedentemente riportata in un sito definito e con un grado definito di eteroplasmia basato sull'analisi nota mirata del mtDNA con eteroplasmia (MITOP). Le frequenze alleliche stimate da TruSight Whole Genome erano altamente correlate alle frequenze previste come previsto dal MITOP. Sono state rilevate tutte le SNV del mtDNA previste, con risultante PPA del 100% (41/41).

Figura 3 Frequenze alleliche delle SNV mitocondriali osservate rispetto alle frequenze alleliche previste in TruSight Whole Genome



È stato eseguito un ulteriore studio sull'accuratezza delle mtSNV utilizzando gli stessi 195 campioni di sangue e il metodo di riferimento descritto negli studi sulla precisione di varianti piccole e CNV. Il set di riferimento negativo è stato definito come mancate identificazioni affidabili delle varianti (filtro SUPERATO) e il set di riferimento positivo è stato definito come identificazioni delle mtSNV con una frequenza allelica > 2,5%. Sono state escluse le posizioni con un filtro non superato o una mancata identificazione delle varianti SNV. Un riepilogo dell'accuratezza per le mtSNV è mostrato nella [Tabella 18](#).

Tabella 18 Precisione delle identificazioni delle SNV del mtDNA in TruSight Whole Genome

Metrica di precisione	Metodo di riferimento conforme positivo	Metodo di riferimento esclusivo positivo	Positivo esclusivo per il saggio	Metodo di riferimento conforme negativo	Metodo di riferimento esclusivo negativo	Negativo esclusivo per il saggio	Valore della metrica di precisione (LCL)
PPA	6.875	0	NA	NA	NA	NA	> 99,99% (99,96%)
TPPV	6.875	NA	6	NA	NA	NA	99,91% (99,83%)
NPA	NA	NA	NA	3.171.049	24.268	20.564	99,24% (99,23%)

Precisione del rilevamento dell'espansione delle STR

La precisione del rilevamento dell'espansione delle STR si è basata su 160 campioni totali preparati mediante estrazione di gDNA da soggetti clinicamente interessati con espansioni in siti specifici confermate mediante PCR/PCR con ripetizione del priming (RP) o Southern Blot eseguiti in un contesto di laboratorio CLIA. Le soglie determinate nella [Tabella 11](#) sono state usate per definire lo stato delle STR di un allele in corrispondenza di un locus specifico come normale (dimensione delle STR stimata inferiore o uguale alla soglia) o espanso (superiore alla soglia).

La PPA è stata calcolata utilizzando solo campioni clinicamente confermati, la NPA è stata calcolata utilizzando solo singoli campioni di sangue presumibilmente sani e il TPPV è stato calcolato in entrambi i gruppi di campioni. Per gli alleli in cui non era disponibile un campione clinicamente confermato, non è stato possibile calcolare la PPA. Inoltre, per gli alleli in cui non era disponibile un campione clinicamente confermato e non vi erano identificazioni false positive, non è stato possibile calcolare il TPPV. L'NPA è stata calcolata per tutte le espansioni delle STR. Il numero di campioni clinici analizzati per una determinata espansione delle STR e le metriche di accuratezza sono riportati nella [Tabella 19](#).

Tabella 19 Metriche di precisione per espansioni delle STR di TruSight Whole Genome

Espansione delle STR	Campioni clinici testati	PPA	TPPV	NPA
AFF2	0	NA	NA	> 99,99%
AR	8	> 99,99%	> 99,99%	> 99,99%
ATN1	4	> 99,99%	> 99,99%	> 99,99%
ATXN1	7	66,67%	> 99,99%	> 99,99%
ATXN10	0	NA	NA	> 99,99%
ATXN2	5	80,00%	> 99,99%	> 99,99%
ATXN3	9	> 99,99%	90,00%	99,74%
ATXN7	2	> 99,99%	> 99,99%	> 99,99%
ATXN7_GCC	0	NA	NA	> 99,99%
ATXN8OS	0	NA	0,00%	99,74%
ATXN8OS_CTA	0	NA	NA	> 99,99%
C9ORF72	21	> 99,99%	> 99,99%	> 99,99%
CACNA1A	5	> 99,99%	83,33%	99,74%
CBL	0	NA	NA	> 99,99%
CNBP	0	NA	NA	> 99,99%
CNBP_CA	0	NA	NA	> 99,99%
CNBP_CAGA	0	NA	NA	> 99,99%
CSTB	0	NA	0,00%	99,74%
DIP2B	0	NA	0,00%	99,74%

Espansione delle STR	Campioni clinici testati	PPA	TPPV	NPA
DMPK	42	> 99,99%	> 99,99%	> 99,99%
FMR1	47	> 99,9%	> 99,99%	> 99,99%
FXN	0	NA	0,00%	99,74%
FXN_A	0	NA	NA	> 99,99%
GLS	0	NA	NA	> 99,99%
HTT	10	> 99,99%	83,33%	99,49%
HTT_CCG	0	NA	NA	> 99,99%
JPH3	0	NA	NA	> 99,99%
NIPA1	0	NA	NA	> 99,99%
NOP56	0	NA	NA	> 99,99%
NOP56_CGCCTG	0	NA	NA	> 99,99%
NOTCH2NL	0	NA	NA	> 99,99%
PABPN1	0	NA	NA	> 99,99%
PHOX2B	0	NA	NA	> 99,99%
PPP2R2B	0	NA	NA	> 99,99%
TBP	0	NA	NA	> 99,99%
TUTTE	160	98,12%	92,35%	99,94%

La valutazione della PPA complessiva del rilevamento dell'espansione delle STR in tutti i loci rappresenta una buona approssimazione della PPA specifica del locus utilizzando i campioni clinici disponibili. La valutazione della PPA specificamente per il locus di FMR1 può fungere da limite inferiore per la PPA dei loci che non sono stati profilati direttamente a causa della sua ampia soglia per l'anomalia delle dimensioni delle STR.

Precisione del rilevamento degli alleli SMN1

La precisione del rilevamento dell'assenza dell'allele C nell'SMN1 (NM_000344.3:c.840C) è stata valutata in 26 campioni clinici di casi con diagnosi di atrofia muscolare spinale (SMA) e perdita di omozigosi dell'esone 7 nell'SMN1 confermata mediante PCR digitale su goccia o MLPA. L'accuratezza nell'identificare la presenza dell'allele c.840C di SMN1 è stata valutata in campioni di sangue individuali presumibilmente sani. A ciascun campione è stata assegnata una singola metrica statistica (Vero positivo [TP], Falso positivo [FP], Falso negativo [FN] o Vero negativo [TN]) in base alla presenza (stato SMA negativo) o assenza (stato SMA positivo) rilevata dell'allele C nella posizione c.840 del gene SMN1 rispetto allo stato previsto. Le stime di PPA, TPPV e NPA sono state effettuate sia per la serie di campioni positivi che negativi (consultare [Tabella 20](#)).

Tabella 20 Metriche di precisione per il rilevamento dell'assenza di alleli SMN1 c.840C

Metrica di precisione	TP	FP	TN	FN	Valore della metrica di precisione
PPA	26	NA	NA	0	> 99,99%
TPPV	26	0	NA	NA	> 99,99%
NPA	NA	0	195	NA	> 99,99%

Ripetibilità

Precisione intra-laboratorio

La precisione intra-laboratorio è stata valutata utilizzando gDNA estratto con una varietà di varianti note in tutto il genoma. Queste includevano mtSNV vicini e ben al di sopra del LoD, campioni contenenti l'allele c.840C di SMN1 e campioni con espansioni di ripetizione di FMR e HTT1 a lunghezze vicine e ben al di sopra del LoD. I campioni sono stati testati utilizzando nove condizioni specifiche disegnate con tre operatori, tre lotti di reagenti di preparazione delle librerie, tre lotti di materiali di consumo di sequenziamento e tre strumenti di sequenziamento.

Ogni campione è stato analizzato in duplicato nella stessa corsa per valutare la variazione intra-corsa e ogni caso di test è stato analizzato due volte per due corse per condizione per la variazione tra corse. Ciascun campione è stato valutato utilizzando 36 osservazioni e il disegno ha consentito 18 gradi di libertà per la valutazione della ripetibilità. L'elenco dei membri del pannello, del tipo di campione e delle varianti valutate per ciascun membro del pannello è mostrato nella [Tabella 21](#). I campioni 1-4 e 9-12 sono stati derivati sia da maschi che da femmine di discendenza caucasica, africana e asiatica autoidentificata per fornire un set di campioni diversificato.

Tabella 21 Composizione del campione del pannello utilizzato per lo studio di precisione intra-laboratorio

Pannello	N. campione	Tipo di campione	Varianti
A	1	gDNA dal sangue	Varianti piccole, CNV, ROH, STR non espanso, presenza di SMN1 c.840C
	2	gDNA dal sangue	Varianti piccole, CNV, ROH, STR non espanso, presenza di SMN1 c.840C
	3	gDNA dal sangue	Varianti piccole, CNV, ROH, STR non espanso, presenza di SMN1 c.840C
	4	gDNA dal sangue	Varianti piccole, CNV, ROH, STR non espanso, presenza di SMN1 c.840C
	5	Miscela artificiale di gDNA dal sangue	SNV mitocondriali a basso livello di LoD
	6	Linea cellulare artificiale NA20241 ¹	STR espanso in loci FMR1 a basso livello di LoD
	7	Linea cellulare artificiale NA20208	STR espanso in loci HTT a basso livello di LoD
	8	Linea cellulare artificiale NA23686	Assenza di SMN1 c.840C
B	9	gDNA dal sangue	Varianti piccole, CNV, ROH, STR non espanso, presenza di SMN1 c.840C
	10	gDNA dal sangue	Varianti piccole, CNV, ROH, STR non espanso, presenza di SMN1 c.840C
	11	gDNA dal sangue	Varianti piccole, CNV, ROH, STR non espanso, presenza di SMN1 c.840C
	12	gDNA dal sangue	Varianti piccole, CNV, ROH, STR non espanso, presenza di SMN1 c.840C
	13	Miscela artificiale di gDNA dal sangue	mtSNV a livello di LoD elevato
	14	Linea cellulare artificiale NA07862	STR espanso in loci FMR1 a livello di LoD elevato
	15	Linea cellulare artificiale NA20253	STR espanso nei loci HTT a livello di LoD elevato
	16	Linea cellulare artificiale NA03814	Assenza di SMN1 c.840C

Livello di LoD elevato: Frequenza allelica variante circa a 2,0x – 4,0x LoD.

Basso livello di LoD: Frequenza allelica variante circa a 1,0x – 1,5x LoD.

¹ I risultati per NA20241 non sono stati riportati nei numeri finali in quanto è stato determinato che era significativamente inferiore a 1,0x LoD e quindi non soddisfaceva i requisiti del campione.

Nella valutazione qualitativa, vengono riportate le metriche di riproducibilità trattando le varianti come entità qualitative (variante presente o variante non presente). Diverse definizioni di identificazioni positive o negative e diverse metriche qualitative sono state valutate e riportate per ciascun tipo di variante (Tabella 22). Al momento della valutazione della riproducibilità di varianti piccole, identificazione delle CNV e ROH, le identificazioni delle varianti effettuate in un replicato di una corsa di caratterizzazione sono state utilizzate per ciascun campione che fungeva da punto di confronto per tutti gli altri replicati di quel campione nello studio.

Tabella 22 Riepilogo della valutazione qualitativa della riproducibilità per ciascun tipo di variante

Tipo di variante	Positivo	Negativo	Tipo di confronto	Metriche qualitative
Varianti piccole	Identificazione della variante che supera i filtri	Identificazione di riferimento omozigote che supera i filtri	Concordanza con il set di identificazione dalle corse di caratterizzazione iniziali	Concordanza positiva media (APA) e concordanza negativa media (ANA)
CNV	Identificazione delle CNV che supera i filtri	Posizioni genomiche che non si sovrappongono a un'identificazione di una variante del numero di copie che supera i filtri	Concordanza con il set di identificazione dalle corse di caratterizzazione iniziali	APA e ANA
ROH	Identificazione delle ROH	Posizioni genomiche che non si sovrappongono a un'identificazione delle ROH	Concordanza con il set di identificazione dalle corse di caratterizzazione iniziali	APA e ANA
Espansione delle STR	Campione con espansione delle STR in almeno un locus mirato	Campione senza espansioni in uno qualsiasi dei loci target	Concordanza con lo stato del campione definito dalla caratterizzazione del campione mediante saggio ortogonale	Percentuale di identificazioni positive (PPC) e Percentuale di identificazioni negative (PNC)
Rilevamento di SMN1 c.840C	Campione senza allele C in posizione c.840 di SMN1 (SMA positivo)	Campione contenente almeno una copia dell'allele C in posizione c.840 di SMN1 (SMA negativo)	Concordanza con lo stato del campione definito dalla caratterizzazione del campione mediante saggio ortogonale	PPC e PNC

Tipo di variante	Positivo	Negativo	Tipo di confronto	Metriche qualitative
mtSNV	Identificazione delle SNV mitocondriali che superano i filtri	Posizione non variante del cromosoma mitocondriale che supera i filtri	Concordanza con le identificazioni di varianti e mancate identificazioni di varianti effettuate in campioni non diluiti	PPC e PNC

La valutazione quantitativa dei diversi tipi di varianti ha comportato una valutazione della variabilità delle metriche quantitative che sono alla base delle identificazioni qualitative o, nel caso di varianti piccole, delle metriche di concordanza relative a un insieme di identificazioni di riferimento. Questo studio ha eseguito sia una valutazione della variabilità totale nelle metriche quantitative tra i replicati sia il contributo di diversi fattori inclusi nello studio alla variabilità in tali metriche quantitative attraverso l'Analisi dei componenti della varianza. La [Tabella 23](#) riassume le metriche quantitative utilizzate nell'analisi di ciascun tipo di variante nonché i fattori che sono stati valutati per il contributo alla variabilità nella metrica quantitativa.

Tabella 23 Riepilogo delle metriche quantitative utilizzate nella valutazione della precisione per i tipi di varianti di differenza

Tipo di variante	Metriche quantitative	Fattori valutati per il contributo alla variabilità
Varianti piccole	APA e ANA	Operatore, lotto kit preparazione librerie, strumento, lotto materiali di consumo di sequenziamento, sottotipo variante, contesto genomico
CNV	Profondità di copertura normalizzata sulla regione CNV	Operatore, lotto kit preparazione librerie, strumento, lotto materiali di consumo di sequenziamento, sottotipo variante, lunghezza variante
ROH	Punteggio delle ROH sulla regione ROH	Operatore, lotto kit preparazione librerie, strumento, lotto materiali di consumo di sequenziamento, sottotipo variante, lunghezza variante
Espansione delle STR	Stima delle dimensioni delle STR	Operatore, lotto kit preparazione librerie, strumento, lotto materiali di consumo di sequenziamento, sito STR, lunghezza STR
Rilevamento di SMN1 c.840C	Report di probabilità logaritmica per la presenza dell'allele di riferimento (C) nella posizione target	Operatore, lotto kit preparazione librerie, strumento, lotto materiali di consumo di sequenziamento, stato SMA

Tipo di variante	Metriche quantitative	Fattori valutati per il contributo alla variabilità
SNV mitocondriali	Frequenza allelica delle varianti	Operatore, lotto kit preparazione librerie, strumento, lotto materiali di consumo di sequenziamento, posizione variante, frequenza allele variante prevista

I risultati per l'analisi dei componenti della varianza sono presentati nella [Tabella 24](#). Per le varianti piccole, la maggior parte della varianza è stata attribuita all'errore residuo e non è stata spiegata dai fattori correlati al saggio inclusi nel disegno, tra cui il lotto del kit di sequenziamento, lo strumento di sequenziamento, il lotto del kit di preparazione delle librerie, l'operatore e da corsa a corsa. L'unica eccezione è stata osservata per le SNV in regioni di affidabilità intermedie per le quali la maggior parte della varianza è stata attribuita al lotto del kit di sequenziamento. In generale, una maggiore quantità di varianza è stata attribuita a fattori correlati al saggio per varianti piccole nelle regioni a bassa affidabilità del genoma. Per tutti gli altri tipi di varianti, la maggior parte della varianza è stata attribuita a un errore residuo e non a fattori correlati al saggio. Questo studio dimostra che per la maggior parte dei sottotipi di varianti piccole, il filtraggio per regioni di affidabilità alta e intermedia nel genoma può essere utilizzato per aumentare la ripetibilità e ridurre la variabilità del saggio. [Riproducibilità esterna a pagina 63](#) fornisce un'analisi completa della riproducibilità del saggio.

Tabella 24 Risultati dello studio di analisi delle componenti di varianza

Metrica	Sottotipi di variante	Livello di affidabilità	Residua	Lotto kit sequenziamento	Da corsa a corsa	Strumento	Lotto kit di preparazione librerie	Operatore
APA	Delezione breve (1-5 bp)	Alto	79,36%	17,52%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%
		Intermedio	76,97%	18,59%	1,53%	0,00%	2,91%	0,00%
		Basso	67,85%	24,87%	4,4%	0,00%	2,88%	0,00%
	Delezione media (6-15 bp)	Intermedio	61,17%	29,06%	7,42%	0,00%	2,35%	0,00%
		Basso	59,33%	31,76%	6,38%	0,17%	2,35%	0,00%
	Delezione lunga (16-31 bp)	Intermedio	52,93%	33,72%	11,67%	0,17%	1,51%	0,00%
		Basso	49,10%	37,01%	11,08%	1,42%	1,39%	0,00%
	Inserzione breve (1-5 bp)	Alto	89,93%	7,32%	1,76%	0,00%	0,99%	0,00%
		Intermedio	74,52%	19,96%	3,44%	0,00%	2,08%	0,00%
		Basso	60,64%	29,72%	8,49%	0,00%	1,15%	0,00%
	Inserzione media (6-15 bp)	Intermedio	81,76%	15,78%	0,00%	0,00%	2,41%	0,06%
		Basso	51,28%	35,07%	12,07%	0,00%	1,58%	0,00%
	Inserzione lunga (16-31 bp)	Intermedio	87,59%	9,83%	1,18%	0,00%	1,40%	0,00%
		Basso	52,47%	35,32%	10,14%	0,23%	1,85%	0,00%
	SNV		Alto	78,01%	17,45%	0,00%	0,13%	1,23%
Intermedio			79,71%	16,95%	0,77%	0,20%	1,29%	1,09%
Basso			56,63%	36,08%	6,97%	0,22%	0,00%	0,09%
ANA	SNV	Alto	55,07%	21,84%	21,07%	1,80%	0,21%	0,00%
		Intermedio	28,53%	49,08%	20,11%	1,27%	1,00%	0,00%
		Basso	51,78%	36,04%	9,76%	2,42%	0,00%	0,00%

Metrica	Sottotipi di variante	Livello di affidabilità	Residua	Lotto kit sequenziamento	Da corsa a corsa	Strumento	Lotto kit di preparazione librerie	Operatore
Profondità	GUADAGNO DI CNV (10 kbp, 25 kbp)	NA	73,28%	2,87%	0,00%	0,00%	1,01%	0,00%
	GUADAGNO DI CNV (25 kbp, 50 kbp)	NA	72,99%	5,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,56%
	GUADAGNO DI CNV (50 kbp, 100 kbp)	NA	66,40%	5,16%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	GUADAGNO DI CNV (100 kbp, 500 kbp)	NA	43,51%	14,92%	14,01%	0,20%	0,00%	15,72%
	PERDITA DI CNV (10 kbp, 25 kbp)	NA	83,41%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	PERDITA DI CNV (25 kbp, 50 kbp)	NA	84,67%	1,20%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	PERDITA DI CNV (50 kbp, 100 kbp)	NA	84,16%	2,43%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	PERDITA DI CNV (100 kbp, 500 kbp)	NA	81,25%	5,22%	0,00%	0,00%	0,00%	0,55%

Metrica	Sottotipi di variante	Livello di affidabilità	Residua	Lotto kit sequenziamento	Da corsa a corsa	Strumento	Lotto kit di preparazione librerie	Operatore
Punteggio sulla regione	ROH (1 kbp, 10 kbp)	NA	74,32%	1,65%	0,00%	0,00%	0,00%	0,52%
	ROH (10 kbp, 25 kbp)	NA	84,78%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ROH (25 kbp, 50 kbp)	NA	84,92%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ROH (50 kbp, 100 kbp)	NA	85,63%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ROH (100 kbp, 500 kbp)	NA	85,76%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ROH \geq 500 kbp	NA	84,81%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Metrica	Sottotipi di variante	Livello di affidabilità	Residua	Lotto kit sequenziamento	Da corsa a corsa	Strumento	Lotto kit di preparazione librerie	Operatore
Stima delle dimensioni per i loci STR ¹	AFF2	NA	99,43%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ATXN7	NA	100%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ATXN7_GCC	NA	99,43%	0,57%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	CNBP	NA	100%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	CNBP_CA	NA	95,45%	4,55%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	CSTB	NA	96,45%	0,87%	2,57%	0,00%	0,00%	0,11%
	DIP2B	NA	100%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	FMR1	NA	71,02%	10,06%	0,00%	17,33%	0,64%	0,95%
	FXN_A	NA	94,52%	1,37%	0,00%	1,37%	1,37%	1,37%
	HTT	NA	82,23%	0,00%	11,99%	3,81%	0,00%	1,97%
	HTT_CCG	NA	99,43%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	NOTCH2NL	NA	99,43%	0,00%	0,00%	0,29%	0,29%	0,00%
	TBP	NA	90,91%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Distribuzioni dei rapporti di log-verosimiglianza	c.840C in NA03814	NA	65,71%	18,98%	0,00%	0,00%	0,00%	15,32%
	c.840C in NA23686	NA	87,64%	0,00%	0,00%	5,90%	0,00%	6,46%
VAF	mtSNV vicino al LOD	NA	83,13%	0,37%	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%

¹ L'analisi dei componenti della varianza non è stata eseguita per i loci per i quali non è stata osservata alcuna varianza.

Inserto della confezione

Riproducibilità esterna

La riproducibilità esterna è stata determinata utilizzando un singolo lotto di reagenti di preparazione e sequenziamento delle librerie presso tre centri sperimentali esterni con due operatori presso ciascun centro. Gli stessi campioni utilizzati nello studio [Precisione intra-laboratorio a pagina 54 \(Tabella 21\)](#) sono stati utilizzati nello studio di riproducibilità con un'eccezione: il campione NA20241 è stato sostituito con NA20239 per valutare l'espansione delle STR dei loci FMR1 a basso LoD. In totale, 16 campioni unici sono stati analizzati come due sottopannelli di otto campioni unici ciascuno (pannello A e pannello B) da ciascun operatore presso ciascun centro. Sono state eseguite tre corse di sequenziamento per le librerie duplicate di ciascun sottopannello per un totale di 36 corse di sequenziamento per campione unico.

Il tasso di superamento dei campioni in 576 librerie di campioni con corse di sequenziamento valide, definito come il numero di campioni che superano le metriche del CQ della libreria di campioni al primo tentativo, è stato del 99,1% (571/576; IC al 95%: 98,0%, 99,6%). Tutti i risultati del test sono basati su test iniziali.

La riproducibilità di SNV, inserzioni, delezioni, CNV e ROH è stata valutata confrontando i dati con un set di identificazioni di riferimento in base alle prestazioni abituali in tre corse di caratterizzazione ([Tabella 25](#) e [Tabella 26](#)). La riproducibilità delle espansioni delle STR, l'assenza dell'allele c.840C di SMN1 e delle mtSNV è stata valutata confrontando i dati con lo stato noto ([Tabella 27](#)).

Tabella 25 Riproducibilità di TruSight Whole Genome per SNV, CNV e ROH

Tipo di variante — stratificazione	Identificazioni conformi positive ¹ / Identificazioni positive ²			Concordanza positiva media (%) (IC al 95%) ³
	Sito 1	Sito 2	Sito 3	
Varianti piccole (alta affidabilità)				
SNV	687.996.150 /	666.509.635 /	688.001.697 /	99,9
	688.770.402	667.253.493	688.766.887	(99,9-99,9)
Inserzioni — 1-5 bp	34.087.135 /	33.025.772 /	34.089.204 /	99,9
	34.137.298	33.073.087	34.137.792	(99,9-99,9)
Delezioni — 1-5 bp	44.096.186 /	42.733.935 /	44.102.515 /	99,6
	44.255.442	42.883.089	44.256.695	(99,6-99,6)
Varianti piccole (affidabilità intermedia)				
SNV	42.238.226 /	40.920.370 /	42.236.751 /	98,8
	42.737.228	41.391.560	42.725.827	(98,8-98,9)
Inserzioni — 1-5 bp	11.075.073 /	10.734.488 /	11.080.468 /	98,9
	11.204.210	10.855.790	11.204.818	(98,9-99,9)
Inserzioni — 6-15 bp	4.307.181 /	4.173.626 /	4.308.408 /	99,3
	4.339.975	4.205.261	4.340.277	(99,2-99,3)
Inserzioni — ≥16 bp	611.952 /	593.114 /	612.222 /	96,8
	632.214	612.877	632.498	(96,8-96,8)
Delezioni — 1-5 bp	24.571.502 /	23.814.655 /	24.586.095 /	98,9
	24.851.492	24.076.930	24.855.041	(98,9-98,9)
Delezioni — 6-15 bp	8.737.319 /	8.473.410 /	8.746.773 /	98,2
	8.900.796	8.624.403	8.902.016	(98,2-98,2)
Delezioni — ≥16 bp	3.590.282 /	3.481.192 /	3.594.420 /	95,0
	3.779.907	3.662.448	3.780.659	(95,0-95,0)
Varianti piccole (bassa affidabilità)				
SNV	78.507.103 /	76.365.789 /	78.863.977 /	81,2
	96.859.682	94.066.720	97.058.652	(81,2-81,2)
Inserzioni — 1-5 bp	17.312.805 /	16.859.987 /	17.406.355 /	89,6
	19.370.351	18.807.745	19.418.516	(89,5-89,6)

Tipo di variante — stratificazione	Identificazioni conformi positive ¹ / Identificazioni positive ²			Concordanza positiva media (%) (IC al 95%) ³
	Sito 1	Sito 2	Sito 3	
Inserzioni — 6-15 bp	5.543.985 /	5.404.652 /	5.584.241 /	85,1
	6.529.886	6.338.556	6.550.066	(85,1-85,2)
Inserzioni — ≥16 bp	3.284.197 /	3.205.165 /	3.314.025 /	77,0
	4.275.286	4.158.315	4.298.399	(77,0-77,0)
Delezioni — 1-5 bp	31.659.416 /	30.751.952 /	31.746.379 /	92,7
	34.194.748	33.158.757	34.226.245	(92,7-92,7)
Delezioni — 6-15 bp	9.189.220 /	8.928.794 /	9.217.516 /	92,1
	9.987.568	9.684.179	9.995.101	(92,1-92,2)
Delezioni — ≥16 bp	3.335.400 /	3.241.968 /	3.346.219 /	85,4
	3.909.364	3.791.331	3.912.857	(85,4-85,5)
CNV — guadagni ≥10 kbp	7.883 /	7.664 /	7.916 /	95,5
	8.275	8.012	8.282	(95,2-95,8)
CNV — perdite ≥10 kbp	11.517 /	11.248 /	11.516 /	95,3
	12.089	11.777	12.113	(95,1-95,5)
ROH — ≥500 kbp	6.641 /	6.519 /	6.616 /	98,0
	6.765	6.663	6.756	(97,8-98,2)

¹ Numero totale di identificazioni conformi positive = query conforme positiva (QCP) + riferimento conforme positivo (RCP).

² Numero totale di identificazioni positive = query conforme positiva (QCP) + query esclusiva positiva (QEP) + riferimento conforme positivo (RCP) + riferimento esclusivo positivo (REP).

³ L'intervallo di confidenza bilaterale al 95% è calcolato utilizzando il metodo del punteggio di Wilson.

Tabella 26 Riproducibilità di TruSight Whole Genome per ANA di SNV, CNV e ROH

Tipo di variante — stratificazione	Identificazioni conformi negative ¹ / Identificazioni negative ²			Media concordanza negativa (%) (IC al 95%) ³
	Sito 1	Sito 2	Sito 3	
Varianti piccole (alta affidabilità)	486.282.620.918 /	470.948.205.740 /	486.285.759.770 /	> 99,9
	486.388.081.375	471.054.131.230	486.389.857.817	(> 99,9-> 99,9)
Varianti piccole (affidabilità intermedia)	17.249.915.828 /	16.699.106.194 /	17.253.834.878 /	99,0
	17.427.817.811	16.874.794.553	17.429.035.482	(99,0-99,0)

Tipo di variante — stratificazione	Identificazioni conformi negative ¹ / Identificazioni negative ²			Media concordanza negativa (%) (IC al 95%) ³
	Sito 1	Sito 2	Sito 3	
Varianti piccole (bassa affidabilità)	24.072.615.254 /	23.454.103.344 /	24.180.801.788 /	94,0
	25.608.493.410	24.947.163.687	25.695.956.102	(94,0-94,0)
CNV — guadagni ≥10 kbp	592.486.270.144 /	573.973.293.084 /	592.487.297.632 /	> 99,9
	592.500.222.476	573.985.772.396	592.500.614.241	(> 99,9-> 99,9)
CNV — perdite ≥10 kbp	592.548.802.882 /	574.030.570.254 /	592.547.683.360 /	> 99,9
	592.559.825.216	574.041.311.257	592.559.141.007	(> 99,9-> 99,9)
ROH — ≥500 kbp	542.968.586.606 /	525.724.060.526 /	543.014.319.116 /	99,2
	547.402.885.905	530.011.754.808	547.444.495.449	(99,2-99,2)

¹ Numero totale di identificazioni conformi negative = 2 × conformi negative (CN).

² Numero totale di identificazioni negative = 2 × conformi negative (CN) + riferimento esclusivo negativo (REN) + query esclusiva negativa (QEN).

³ L'intervallo di confidenza bilaterale al 95% è calcolato utilizzando il metodo del punteggio di Wilson.

Tabella 27 Riproducibilità di TruSight Whole Genome per STR, SMN1 e mtSNV

Tipo di variante – stratificazione	Totale identificazioni positive previste	Identificazioni positive			Totale identificazioni negative previste	Identificazioni negative			Percentuale identificazioni positive (IC al 95%) ¹	Percentuale identificazioni negative (IC al 95%) ¹
		Sito 1	Sito 2	Sito 3		Sito 1	Sito 2	Sito 3		
Espansioni STR - Alto livello di rilevamento (2x-4x LOD)										
Espansioni STR - FMR1	35	12	11	12	NA	NA	NA	NA	100 (90,1-100)	NA
Espansioni STR - HTT	36	12	12	12	NA	NA	NA	NA	100 (90,4-100)	NA
Espansioni STR – FMR1 e HTT combinati	71	24	23	24	NA	NA	NA	NA	100 (94,9-100)	NA
Espansioni STR - Basso livello di rilevamento (1x-1,5x LOD)										
Espansioni STR - FMR1	36	11	10	11	NA	NA	NA	NA	88,9 (74,7-95,6)	NA
Espansioni STR - HTT	36	12	12	12	NA	NA	NA	NA	100 (90,4-100)	NA
Espansioni STR – FMR1 e HTT combinati	72	23	22	23	NA	NA	NA	NA	94,4 (86,6-97,8)	NA
Espansioni STR – 28 loci STR target principali combinati	NA	NA	NA	NA	285	96	93	96	NA	100 (98,7-100)

Tipo di variante – stratificazione	Totale identificazioni positive previste	Identificazioni positive			Totale identificazioni negative previste	Identificazioni negative			Percentuale identificazioni positive (IC al 95%) ¹	Percentuale identificazioni negative (IC al 95%) ¹
		Sito 1	Sito 2	Sito 3		Sito 1	Sito 2	Sito 3		
Assenza di SMN1 c.840C	71	24	24	23	285	96	93	96	100 (94,9-100)	100 (98,7-100)
mtSNV – alto livello (2x-4x LOD)	1.080	360	360	360	457.524	152.491	152.489	152.484	100 (99,6-100)	> 99,9 (> 99,9- > 99,9)
mtSNV – basso livello (1x-1,5x LOD)	1.080	360	359	360	457.524	152.481	152.489	152.483	99,9 (99,5-99,9)	> 99,9 (> 99,9- > 99,9)

¹ L'intervallo di confidenza bilaterale al 95% è calcolato utilizzando il metodo del punteggio di Wilson.

Risoluzione dei problemi

Per risolvere i problemi nel flusso di lavoro, utilizzare la seguente tabella. Se una corsa di sequenziamento o la preparazione delle librerie per un campione non riesce per due volte, potrebbe essere necessaria un'ulteriore operazione di risoluzione dei problemi. Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.

Tipo di tessuto	Osservazione	Possibile Causa	Intervento raccomandato
Problema di creazione della corsa	La corsa pianificata associata non può essere selezionata manualmente in NovaSeq 6000Dx Control Software dopo il caricamento dei materiali di consumo	È stato specificato un ID della provetta della libreria errato durante la pianificazione della corsa	Consultare Revisione della corsa in Guida TruSight Whole Genome Analysis Application (documento n. 200049931).

Tipo di tessuto	Osservazione	Possibile Causa	Intervento raccomandato
Problema con il sequenziamento	Stato errore di sequenziamento in Illumina Run Manager	La corsa di sequenziamento è stata interrotta o non è stata completata a causa di NovaSeq 6000Dx o a causa di un problema di manipolazione dei materiali di consumo di sequenziamento	Consultare la Documentazione tecnica per NovaSeq 6000Dx Instrument (n. documento 200010105). Dopo aver risolto il problema, la libreria può essere nuovamente raggruppata in pool e risequenziata fino a una volta (a causa del volume).
		La corsa è stata completata ma il clustering non è andato a buon fine. Possibile problema di NovaSeq 6000Dx, problema di manipolazione del materiale di consumo di sequenziamento o errore catastrofico di preparazione delle librerie a causa di un problema di manipolazione del reagente o di un errore dell'operatore (ad es. ha saltato una fase o eliminato il surnatante invece di trasferirlo durante la selezione delle dimensioni)	Valutare le rese delle singole librerie in FLP mediante qPCR per $\geq 0,94$ nM (presupponendo una dimensione dell'inserzione di 450 bp) per escludere i problemi relativi alla preparazione delle librerie rispetto a quelli correlati al sequenziamento. Se si escludono problemi di preparazione delle librerie e si sospetta un problema correlato al sequenziamento, consultare la Documentazione tecnica per NovaSeq 6000Dx Instrument (n. documento 200010105). Se si sospetta un problema di preparazione delle librerie, consultare Suggerimenti e tecniche a pagina 13 e le Istruzioni per l'uso a pagina 16 prima di ripetere la preparazione e il sequenziamento della libreria. In caso di guasti ripetuti, contattare l'assistenza tecnica Illumina.

Tipo di tessuto	Osservazione	Possibile Causa	Intervento raccomandato
Impossibile trasferire i dati di sequenziamento al server	Trasferimento dei file di sequenziamento per dello stato di errore dell'analisi in Illumina Run Manager	Problema di connettività di rete o interruzione dell'alimentazione dello strumento o del server durante il trasferimento dei dati della corsa	<p data-bbox="1213 204 1818 595">Verificare l'interruzione dell'alimentazione o la perdita della connettività di rete dello strumento. Attendere che il sistema sia inattivo (sequenziamento completo), quindi andare su Instrument Settings (Impostazioni strumento), IVD SETTINGS (IMPOSTAZIONI IVD) per confermare la connessione alla Output Location (Posizione di output) specificata utilizzando la funzione Browse (Sfogliala).</p> <p data-bbox="1213 643 1818 949">Se è necessaria un'ulteriore risoluzione dei problemi, consultare Documentazione tecnica per NovaSeq 6000Dx Instrument (n. documento 200010105). Se dopo aver risolto problemi di connessione o alimentazione, il trasferimento dei file non si riavvia e non viene completato, contattare l'assistenza tecnica Illumina.</p>

Tipo di tessuto	Osservazione	Possibile Causa	Intervento raccomandato
Impossibile avviare l'analisi	Stato dell'analisi non avviata in Illumina Run Manager sebbene il trasferimento del file di sequenziamento per l'analisi sia stato completato	Associazione o connessione tra lo strumento e DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx persa o licenza DRAGEN scaduta.	<p>Attendere che il sistema sia inattivo (sequenziamento completo), quindi andare a DRAGEN per confermare che la licenza DRAGEN è valida. Se la licenza è scaduta, contattare Illumina. Se la licenza è valida, selezionare Run Self-Test (Esegui autotest). Se il test non va a buon fine o se l'opzione per eseguire un autotest non è disponibile, accedere a Instrument (Strumento) per verificare la presenza di un errore relativo all'associazione del server. Consultare la sezione System Configuration (Configurazione del sistema) della Documentazione tecnica per NovaSeq 6000Dx Instrument (n. documento 200010105).</p> <p>L'analisi dovrebbe iniziare automaticamente dopo la risoluzione del problema. Uscire dalla pagina e accedere alla scheda Active Runs (Corse attive) per confermare che l'analisi è in corso. Se il problema persiste, contattare Illumina.</p>

Tipo di tessuto	Osservazione	Possibile Causa	Intervento raccomandato
L'analisi si blocca	Stato di analisi in corso in Illumina Run Manager per molto più tempo del previsto	La connettività di rete o l'alimentazione dello strumento o del server potrebbero essere state interrotte durante l'analisi, causando il blocco dell'analisi	<p>Annullare l'analisi e verificare l'interruzione dell'alimentazione o la perdita della connettività di rete dello strumento.</p> <p>Attendere che il sistema sia inattivo (sequenziamento completo), quindi andare su Instrument Settings (Impostazioni strumento) (IVD SETTINGS - IMPOSTAZIONI IVD) e confermare la connettività alla Output Location (Posizione di output) specificata. Se è necessaria un'ulteriore risoluzione dei problemi, consultare la Documentazione tecnica per NovaSeq 6000Dx Instrument (n. documento 200010105).</p> <p>Dopo aver risolto il problema, rimettere in coda l'analisi senza modifiche. Consultare Guida TruSight Whole Genome Analysis Application (documento n. 200049931).</p>

Tipo di tessuto	Osservazione	Possibile Causa	Intervento raccomandato
Impossibile trasferire i file di analisi	Stato non superato del trasferimento del file di analisi all'archiviazione in Illumina Run Manager	Si è verificato un problema di connettività di rete o un'interruzione dell'alimentazione dello strumento o del server durante il trasferimento del file di analisi	<p>Annullare l'analisi e verificare l'interruzione dell'alimentazione o la perdita della connettività di rete dello strumento.</p> <p>Attendere che il sistema sia inattivo (sequenziamento completo), quindi andare su Instrument Settings (Impostazioni strumento) (IVD SETTINGS - IMPOSTAZIONI IVD) e confermare la connettività alla Output Location (Posizione di output) specificata. Se è necessaria un'ulteriore risoluzione dei problemi, consultare la Documentazione tecnica per NovaSeq 6000Dx Instrument (n. documento 200010105).</p> <p>Dopo aver risolto il problema, rimettere in coda l'analisi senza modifiche. Consultare Guida TruSight Whole Genome Analysis Application (documento n. 200049931).</p>
Analisi non riuscita alla rimessa in coda	Analisi non riuscita dopo la rimessa in coda	Se si rimette in coda l'analisi, la corsa originale potrebbe essere stata eliminata o archiviata e non essere più nella posizione specificata per la posizione di archiviazione esterna	Controllare che la corsa originale sia ancora nella posizione di archiviazione esterna. Se archiviata, recuperarla dall'archivio e rimettere nuovamente in coda l'analisi.

Tipo di tessuto	Osservazione	Possibile Causa	Intervento raccomandato
Il CQ del sequenziamento non viene superato	Riepilogo del risultato del CQ del sequenziamento NON SUPERATO nel report consolidato	“% totale \geq Q30” al di sotto delle specifiche analitiche a causa di una manipolazione errata dei materiali di consumo per il sequenziamento (mancato scongelamento completo o inversione per miscelare dopo lo scongelamento)	Consultare la Documentazione tecnica per NovaSeq 6000Dx Instrument (n. documento 200010105). Dopo aver risolto il problema, la libreria può essere nuovamente raggruppata in pool e risequenziata fino a una volta (a causa del volume).
CQ FASTQ non superato per tutti i campioni	Risultato del CQ del riepilogo FASTQ e CQ del riepilogo delle librerie di campioni NON SUPERATO, con i risultati della metrica del CQ della libreria individuale riportati come ND, per tutti i campioni nel report consolidato con riepilogo dei risultati del CQ del sequenziamento SUPERATO	L’Index Adapter Kit specificato durante Create Run (Crea corsa) non è allineato con quello utilizzato durante la preparazione delle librerie	Visualizzare i campioni per controllare le informazioni sull’indice utilizzate nell’analisi in IRM. Se è necessaria una correzione, consultare Rimettere in coda l’analisi nella Guida TruSight Whole Genome Analysis Application (documento n. 200049931).

Tipo di tessuto	Osservazione	Possibile Causa	Intervento raccomandato
Il CQ FASTQ non viene superato per uno o più campioni in assenza di bassa resa della corsa; Resa totale non indicizzata (GB) ≥ 2.800 GB su S4 o ≥ 1.000 GB su S2	Risultato del CQ del riepilogo FASTQ e CQ del riepilogo delle librerie di campioni NON SUPERATO, con i risultati della metrica di CQ della libreria individuale riportati come ND, per uno o più campioni ma non per tutti i campioni nel report consolidato senza bassa resa della corsa	Errori di utilizzo durante la preparazione o il raggruppamento in pool delle librerie	<p>Valutare il/i volume/i rimanente/i nella piastra libreria finale (FLP) per confermare l'errore di utilizzo dell'omissione dei campioni dalle librerie raggruppate in pool. Il volume consente all'operatore di raggruppare in pool nuovamente e risequenziare fino a una volta. In alternativa, rimettere in coda i campioni con mancato superamento nel lotto di preparazione delle librerie successivo ed eseguirli dopo aver esaminato le Istruzioni per l'uso a pagina 16.</p> <p>Facoltativamente, valutare le rese delle singole librerie in FLP mediante qPCR per $\geq 0,94$ nM (presupponendo una dimensione dell'inserzione di 450 bp) per confermare/escludere problemi relativi alla preparazione delle librerie. Rimettere in coda i campioni con mancato superamento nel lotto di preparazione delle librerie successivo ed eseguirli dopo aver esaminato le Istruzioni per l'uso a pagina 16.</p> <p>Si sconsiglia di raggruppare in pool le librerie tra i diversi lotti di preparazione delle librerie a causa delle fluttuazioni tra lotti nelle rese che possono determinare una maggiore %CV e una maggiore incidenza di mancato superamento della "copertura media autosomica".</p>

Tipo di tessuto	Osservazione	Possibile Causa	Intervento raccomandato
Il CQ FASTQ non viene superato per alcuni ma non tutti campioni con bassa resa della corsa; bassa resa totale non indicizzata (GB), < 2.800 GB su S4 o < 1.000 GB su S2	Risultato del CQ del riepilogo FASTQ e CQ del riepilogo delle librerie di campioni NON SUPERATO, con i risultati della metrica di CQ della libreria individuale riportati come ND, per uno o più campioni ma non per tutti i campioni nel report consolidato con bassa resa della corsa	Può indicare un problema relativo alla preparazione delle librerie o al sequenziamento	<p>Valutare le rese delle singole librerie in FLP mediante qPCR per $\geq 0,94$ nM (presupponendo una dimensione dell'inserzione di 450 bp) per escludere i problemi relativi alla preparazione delle librerie rispetto al sequenziamento.</p> <p>Se si sospetta un problema di sequenziamento, consultare la Documentazione tecnica per NovaSeq 6000Dx Instrument (n. documento 200010105). Dopo aver risolto il problema, le librerie possono essere raggruppate in pool nuovamente e risequenziate fino a una volta (a causa del volume limitato).</p> <p>Se si sospetta un problema di preparazione delle librerie, consultare Suggerimenti e tecniche a pagina 13 e le Istruzioni per l'uso a pagina 16 prima di ripetere la preparazione e il sequenziamento della libreria. In caso di guasti ripetuti, contattare l'assistenza tecnica Illumina.</p>

Tipo di tessuto	Osservazione	Possibile Causa	Intervento raccomandato
CQ della libreria non superato a causa della bassa copertura	Risultato del CQ del riepilogo delle librerie di campioni NON SUPERATO per uno o più campioni nel report consolidato a causa della copertura autosomica media e/o della percentuale di autosoma con copertura superiore a 20X e/o della copertura mitocondriale media sul genoma che non supera le specifiche analitiche	Problema/i di qualità del campione o di preparazione delle librerie	<p>Eseguire la riquantificazione con i controlli di processo per escludere problemi relativi all'input di DNA.</p> <p>Consultare Suggerimenti e tecniche a pagina 13 e le Istruzioni per l'uso a pagina 16 di revisione prima di mettere nuovamente in coda uno o più campioni che non hanno superato il controllo nel successivo lotto di preparazione delle librerie e corsa. Se lo/gli stesso/i campione/i non supera/no il controllo più volte, ciò può indicare uno o più problemi di qualità del campione.</p> <p>Se il mancato superamento viene osservato di nuovo ma con campioni diversi, ciò può indicare un problema relativo alla preparazione delle librerie relativo all'operatore, al reagente, al materiale di consumo o all'apparecchiatura. Se il problema persiste, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.</p>

Tipo di tessuto	Osservazione	Possibile Causa	Intervento raccomandato
CQ della libreria non superato a causa della distorsione GC	Risultato del CQ del riepilogo delle librerie di campioni NON SUPERATO per uno o più campioni nel report consolidato a causa della copertura normalizzata tra il 60% e il 79% degli intervalli GC e/o della copertura normalizzata tra il 20% e il 39% degli intervalli GC che non superano le specifiche analitiche	Eccessivo carry-over di ELM o lavaggio saltato che causa distorsione GC nella copertura	Consultare Suggerimenti e tecniche a pagina 13 e le Istruzioni per l'uso a pagina 16 prima di mettere nuovamente in coda uno o più campioni che non hanno superato il controllo nel successivo lotto di preparazione delle librerie e corsa.
CQ della libreria non superato a causa della contaminazione di uno o più campioni, ma non di tutti i campioni in corsa	Risultato del CQ del riepilogo delle librerie di campioni NON SUPERATO per uno o più campioni ma non tutti i campioni nel report consolidato a causa della contaminazione stimata del campione che non supera le specifiche analitiche	Campione/i contaminato/i o non sono state cambiate le punte durante la preparazione del campione o della libreria	Consultare Suggerimenti e tecniche a pagina 13 e le Istruzioni per l'uso a pagina 16 prima di mettere nuovamente in coda uno o più campioni che non hanno superato il controllo nel successivo lotto di preparazione delle librerie e corsa. Se lo/gli stesso/i campione/i non supera/no il controllo più volte, il DNA del campione potrebbe essere contaminato.

Tipo di tessuto	Osservazione	Possibile Causa	Intervento raccomandato
CQ della libreria non superato a causa della contaminazione per tutti i campioni nella corsa	Il riepilogo dei risultati del CQ delle librerie di campioni è riportato come NON SUPERATO per tutti i campioni nel report consolidato a causa della contaminazione stimata del campione che non supera le specifiche analitiche	Reagente contaminato o non sono state cambiate le punte durante la diluizione del campione o la preparazione delle librerie	Consultare Suggerimenti e tecniche a pagina 13 per evitare la contaminazione. Rimettere in coda i campioni con mancato superamento nel lotto di preparazione delle librerie successivo ed eseguire utilizzando diluizioni di campioni e kit di preparazione delle librerie freschi.
Risultato ND riepilogo ploidia	Il risultato del riepilogo della ploidia è riportato come NA (non determinato) nel Report consolidato	Il sesso è stato indicato come Unknown (Sconosciuto) durante la creazione della corsa DRAGEN ha riportato un risultato di ploidia sessuale diverso da XX o XY, come XO o XXY	Confermare che la “ploidia dei cromosomi sessuali fornita” nel Report consolidato era “Sconosciuto”. Si consiglia di indicare il sesso come “Maschio” o “Femmina” nei dati del campione quando noto durante la creazione della corsa. Rivedere l’output “Stima della ploidia” di DRAGEN nel Report consolidato.

Tipo di tessuto	Osservazione	Possibile Causa	Intervento raccomandato
Risultato DISCORDANT (DISCORDANTE) riepilogo ploidia	Il riepilogo del risultato della ploidia è riportato come DISCORDANT (DISCORDANTE) nel Report consolidato.	Potenziiale problema di scambio dei campioni	Controllare per confermare che i dati del campione inseriti durante Create Run (Crea corsa) siano corretti. Se non sono corretti, rimettere in coda l'analisi con le modifiche. Se sono corretti e si sospetta un problema di scambio dei campioni, si consiglia di rimettere in coda il/i campione/i DISCORDANT (DISCORDANTE) nel successivo lotto di preparazione delle librerie e corsa per evitare la segnalazione di risultati errati. Il software del campione non applica il mancato superamento per un campione con un riepilogo del risultato della ploidia DISCORDANT (DISCORDANTE).

Bibliografia

1. Kashima T, Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet.* 2003;34(4):460-463. doi: 10.1038/ng1207.
2. Chen X, Sanchis-Juan A, French CE, et al. Spinal muscular atrophy diagnosis and carrier screening from genome sequencing data. *Genet Med.* 2020;22(5):945-953. doi: 10.1038/s41436-020-0754-0.
3. Prior TW. Perspectives and diagnostic considerations in spinal muscular atrophy. *Genet Med.* 2010;12(3):145-52. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181c5e713.
4. The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;526:68-74. doi: <https://doi.org/10.1038/nature15393>.
5. Halman A, Dolzhenko E, Oshlack A. STRipy: A graphical application for enhanced genotyping of pathogenic short tandem repeats in sequencing data. *Hum Mutat.* 2022;43(7):859-868. doi: 10.1002/humu.24382. Pubblicazione elettronica 21 aprile 2022. PMID: 35395114; PMCID: PMC9541159.
6. Ibañez K, Polke J, Hagelstrom RT, Dolzhenko E, et al. Whole genome sequencing for the diagnosis of neurological repeat expansion disorders in the UK: a retrospective diagnostic accuracy and prospective clinical validation study. *Lancet Neurol.* 2022;21(3):234-245. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00462-2. PMID: 35182509; PMCID: PMC8850201.
7. Sequeiros J, Seneca S, Martindale J. Consensus and controversies in best practices for molecular genetic testing of *spinocerebellar ataxias*. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(11):1188-95. doi: 10.1038/ejhg.2010.10. Pubblicazione elettronica 24 febbraio 2010. PMID: 20179748; PMCID: PMC2987480.
8. Perlman S. Hereditary Ataxia Overview. 28 ottobre 1998 [aggiornato il 16 novembre 2023]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al. eds. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2024. PMID: 20301317.
9. Gijssels I, Van Mossevelde S, van der Zee J, et al. The C9orf72 repeat size correlates with onset age of disease, DNA methylation and transcriptional downregulation of the promoter. *Mol Psychiatry.* 2016;21(8):1112-24. doi: 10.1038/mp.2015.159. Pubblicazione elettronica 20 ottobre 2015. PMID: 26481318; PMCID: PMC4960451.
10. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron.* 2011;72(2):245-56. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011. Pubblicazione elettronica 21 settembre 2011. PMID: 21944778; PMCID: PMC3202986.
11. Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, et al. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science.* 2001;293(5531):864-7. doi: 10.1126/science.1062125. PMID: 11486088.
12. Lalioti MD, Scott HS, Antonarakis SE. What is expanded in progressive myoclonus epilepsy? *Nat Genet.* 1997;17(1):17. doi: 10.1038/ng0997-17. PMID: 9288090.
13. Joensuu T, Lehesjoki AE, Kopra O. Molecular background of EPM1-Unverricht-Lundborg disease. *Epilepsia.* 2008 ;49(4):557-63. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01422.x. Pubblicazione elettronica 19 novembre 2007. PMID: 18028412.

14. Kamsteeg EJ, Kress W, Catalli C, et al. Best practice guidelines and recommendations on the molecular diagnosis of myotonic dystrophy types 1 and 2. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(12):1203-8. doi: 10.1038/ejhg.2012.108. Pubblicazione elettronica 30 maggio 2012. PMID: 22643181; PMCID: PMC3499739.
15. Biancalana V, Glaeser D, McQuaid S, Steinbach P. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(4):417-25. doi: 10.1038/ejhg.2014.185. Pubblicazione elettronica 17 settembre 2014. PMID: 25227148; PMCID: PMC4666582.
16. Dolzhenko E, Deshpande V, Schlesinger F, et al. ExpansionHunter: a sequence-graph-based tool to analyze variation in short tandem repeat regions. *Bioinformatics.* 2019;35(22):4754-4756. doi: 10.1093/bioinformatics/btz431. PMID: 31134279; PMCID: PMC6853681.
17. van Kuilenburg ABP, Tarailo-Graovac M, Richmond PA, et al. Glutaminase Deficiency Caused by Short Tandem Repeat Expansion in GLS. *N Engl J Med.* 2019;380(15):1433-1441. doi: 10.1056/NEJMoa1806627. PMID: 30970188; PMCID: PMC8819703.
18. Losekoot M, van Belzen MJ, Seneca S, et al; European Molecular Genetic Quality Network (EMQN). EMQN/CMGS best practice guidelines for the molecular genetic testing of Huntington disease. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(5):480-6. doi: 10.1038/ejhg.2012.200. Pubblicazione elettronica 19 settembre 2012. PMID: 22990145; PMCID: PMC3641377.
19. Holmes SE, O'Hearn E, Rosenblatt A, et al. A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nat Genet.* 2001;29(4):377-8. doi: 10.1038/ng760. Erratum in: *Nat Genet* 2002 Jan;30(1):123. PMID: 11694876.
20. Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, et al. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum Genet.* 2011;89(1):121-30. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.05.015. Pubblicazione elettronica 16 giugno 2011. PMID: 21683323; PMCID: PMC3135815.
21. García-Murias M, Quintáns B, Arias M, et al. 'Costa da Morte' ataxia is spinocerebellar ataxia 36: clinical and genetic characterization. *Brain.* 2012;135(Pt 5):1423-35. doi: 10.1093/brain/aws069. Pubblicazione elettronica 3 aprile 2012. PMID: 22492559; PMCID: PMC3338928.
22. Ishiura H, Shibata S, Yoshimura J, et al. Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. *Nat Genet.* 2019;51(8):1222-1232. doi: 10.1038/s41588-019-0458-z. Pubblicazione elettronica 22 luglio 2019. PMID: 31332380.
23. Sone J, Mitsuhashi S, Fujita A, et al. Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease. *Nat Genet.* 2019;51(8):1215-1221. doi: 10.1038/s41588-019-0459-y. Pubblicazione elettronica 22 luglio 2019. PMID: 31332381.
24. Amiel J, Laudier B, Attié-Bitach T, et al. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet.* 2003;33(4):459-61. doi: 10.1038/ng1130. Pubblicazione elettronica 17 marzo 2003. PMID: 12640453.

Appendice A

Set di indici S4 1

ID pozzetto Piastra indici	Nome indice	Basi i7	Basi i5
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGCACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAACCTGAA
F01	UDP0042	GTCTAATGGC	AGTGGTCAGG
G01	UDP0043	CCATCTCGCC	TTCTATGGTT
H01	UDP0044	CTGCGAGCCA	AATCCGGCCA
A02	UDP0065	TAATGTGTCT	GTAAGGCATA
B02	UDP0066	ATACCAACGC	AATTGCTGCG
C02	UDP0067	AGGATGTGCT	TTACAATTCC
D02	UDP0068	CACGGAACAA	AACCTAGCAC
E02	UDP0069	TGGAGTACTT	TCTGTGTGGA
F02	UDP0070	GTATTGACGT	GGAATTCCAA
G02	UDP0071	CTTGTACACC	AAGCGCGCTT
H02	UDP0072	ACACAGGTGG	TGAGCGTTGT

Set di indici S4 2

ID pozzetto Piastra indici	Nome indice	Basi i7	Basi i5
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGCGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC
G03	UDP0087	CCTCTACATG	GATACCTCCT

ID pozzetto Piastra indici	Nome indice	Basi i7	Basi i5
H03	UDP0088	GGAGCGTGTA	ATCCGTAAGT
A04	UDP0089	GTCCGTAAGC	CGTGTATCTT
B04	UDP0090	ACTTCAAGCG	GAACCATGAA
C04	UDP0091	TCAGAAGGCG	GGCCATCATA
D04	UDP0092	GCGTTGGTAT	ACATACTTCC
E04	UDP0093	ACATATCCAG	TATGTGCAAT
F04	UDP0094	TCATAGATTG	GATTAAGGTG
G04	UDP0095	GTATTCCACC	ATGTAGACAA
H04	UDP0096	CCTCCGTCCA	CACATCGGTG

Set di indici S2 1

ID pozzetto Piastra indici	Nome indice	Basi i7	Basi i5
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGCACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAACCTGAA
F01	UDP0042	GTCTAATGGC	AGTGGTCAGG

Set di indici S2 2

ID pozzetto Piastra indici	Nome indice	Basi i7	Basi i5
A02	UDP0065	TAATGTGTCT	GTAAGGCATA
B02	UDP0066	ATACCAACGC	AATTGCTGCG
C02	UDP0067	AGGATGTGCT	TTACAATTCC
D02	UDP0068	CACGGAACAA	AACCTAGCAC
E02	UDP0069	TGGAGTACTT	TCTGTGTGGA
F02	UDP0070	GTATTGACGT	GGAATTCCAA

Set di indici S2 3

ID pozzetto Piastra indici	Nome indice	Basi i7	Basi i5
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGCGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC

Set di indici S2 4

ID pozzetto Piastra indici	Nome indice	Basi i7	Basi i5
A04	UDP0089	GTCCGTAAGC	CGTGTATCTT
B04	UDP0090	ACTTCAAGCG	GAACCATGAA
C04	UDP0091	TCAGAAGGCG	GGCCATCATA
D04	UDP0092	GCGTTGGTAT	ACATACTTCC
E04	UDP0093	ACATATCCAG	TATGTGCAAT
F04	UDP0094	TCATAGATTG	GATTAAGGTG

Appendice B

Calcoli aggiuntivi per l'Opzione 1: input di DNA 280 ng per i metodi di quantificazione ad ampio intervallo Quant e Qubit

Calcolo dei limiti di concentrazione per la concentrazione di soluzione madre di DNA da 11,2 a 154,0 ng/μl:

La concentrazione minima si basa su 280,0 ng di input di DNA / 25,0 μl di volume = 11,2 ng/μl.

In base a un volume minimo di pipettaggio di 2,0 μl, la concentrazione massima è di 280 ng*1,1 (eccedenza del 10%) / 2,0 μl = 154,0 ng/μl, in un volume totale di 27,5 μl.

Esempio di calcoli con input di DNA 280,0 ng

Esempio pratico di concentrazione di soluzione madre di DNA = 95,0 ng/μl:

- Volume di soluzione madre di DNA (μl) = $280,0 \text{ ng} \times 1,1 / 95,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$, arrotondati a 3,24 μl per un pipettaggio accurato con P-10.
- Il volume totale di DNA diluito è fissato a 27,5 μl.
- Volume RSB (μl) = $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$, arrotondati a 24,3 μl per pipettaggio accurato con P-200.

Esempio pratico di concentrazione di soluzione madre di DNA = 308,0 ng/μl:

- Il volume della soluzione madre di DNA (μl) è fissato a 2,0 μl
- Volume totale di DNA diluito (μl) = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l} / 11,2 \text{ ng}/\mu\text{l} = 55,0 \mu\text{l}$
- Volume RSB (μl) = $55,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 53,0 \mu\text{l}$

Calcoli aggiuntivi per l'opzione 2: input di DNA 350 ng per il metodo di quantificazione Accuclear Ultra High Sensitivity

Calcolo dei limiti di concentrazione per concentrazioni di soluzione madre di DNA da 14,0 a 192,5 ng/μl:

La concentrazione minima si basa su 350,0 ng di input di DNA / 25,0 μl di volume = 14,0 ng/μl.

In base a un volume minimo di pipettaggio di 2,0 μl, la concentrazione massima è di 350 ng*1,1 (eccedenza del 10%) / 2,0 μl = 192,5 ng/μl.

Esempio di calcoli con input di DNA 350,0 ng

Esempio pratico di concentrazione di soluzione madre di DNA = 118,75 ng/μl:

- Volume di soluzione madre DNA (μl) = $350,0 \text{ ng} \times 1,1 / 118,75 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$, arrotondati a 3,24 μl per pipettaggio accurato con P-10
- Il volume totale di DNA diluito è fissato a 27,5 μl.

- Volume RSB (μl) = $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$, arrotondati a $24,3 \mu\text{l}$ per pipettaggio accurato con P-200.

Esempio pratico di concentrazione di soluzione madre di DNA = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l}$:

- Il volume della soluzione madre di DNA (μl) è fissato a $2,0 \mu\text{l}$
- Volume totale di DNA diluito (μl) = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l} / 14,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 44,0 \mu\text{l}$
- Volume RSB (μl) = $44,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 42,0 \mu\text{l}$

Cronologia revisioni

Documento	Data	Descrizione della modifica
Documento n. 200050132 v00.1	Maggio 2024	Volume di input corretto per il metodo di quantificazione Accuclear Ultra High Sensitivity.
Documento n. 200050132 v00	Aprile 2024	Versione iniziale.

Insero della confezione

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

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

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

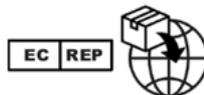
© 2024 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

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

Informazioni di contatto



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



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
The Netherlands

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 sulla scheda *Documentation* (Documentazione) per il kit in uso.