



SPECIFICHE TECNICHE DI ANALISI E REFERTAZIONE DATI NGS

1. Per ogni campione i requisiti minimi di qualità per proseguire nell'analisi sono un coverage $\geq 1000X$ e una copertura minima del target del 95% con numero di reads ≥ 500 ; sono escluse dall'analisi tutte le regioni con copertura inferiore a 100X (eventualmente disponibili su richiesta);
2. Sono identificate le varianti nelle regioni codificanti e nei siti di splicing con VAF (Variant Allele Frequency) $\geq 5\%$ ed escluse dalla refertazione le varianti con frequenza superiore al 1% nella popolazione;
3. I programmi utilizzati per l'allineamento e la chiamata delle varianti sono:
 - Per i pannelli NGS custom: NextGene® Software (US Patent No. 8,271,206) che utilizza come riferimento lo Human Reference Genome, versione hg 38;
 - Per i pannelli NGS commerciali (varianti di DNA e riarrangiamenti): Ion Reporter® (Thermo Fisher) dedicato alla piattaforma che utilizza come riferimento lo Human reference Genome, versione hg19;
4. La variante *JAK2* c.1849G>T: p. V617F viene refertata anche in caso di VAF $< 5\%$ a seguito di validazione con metodica standard di riferimento più sensibile (Real Time-PCR). In tali casi il valore dell'allele burden indicato nel referto corrisponde a quello ottenuto in Real-Time PCR.
5. Per l'identificazione della variante *KIT* c.2447A>T: p. D816V la metodica di NGS non è sufficientemente sensibile e si rimanda, per la sua specifica valutazione, alla metodica di riferimento (indicata nel documento D/2281L/3-Tabella esami Laboratorio CRIMM);
6. La regione dell'esone 12 di *ASXL1* corrispondente all'intervallo amminoacidico 630-680 è analizzata con metodica Sanger;
7. L'analisi delle varianti relativa alla predizione funzionale e alla frequenza di popolazione si effettua consultando i seguenti database pubblici: COSMIC, dbSNP, GnomAD; Tool di predizione funzionali in silico (SIFT, PolyPhen2, Mutation Taster, FATHMM, CADD) e GERP++. Per le varianti di splicing si consulta il tool Human Splicing Finder.



8. Nel referto, per ogni variante nota in letteratura, sono riportati preferenzialmente riferimenti ritenuti significativi sulla base del contesto di risposta. La regola adottata dal laboratorio è di segnalare linee guida e preferire studi su popolazioni rispetto a singoli case report. Nel caso la variante riscontrata non sia stata descritta in letteratura, viene riportato un riferimento generico di letteratura.
9. Non possono essere esclusi falsi positivi/negativi per specifiche caratteristiche della sequenza come regioni ripetute e/o ad alta omologia. Inoltre, la metodica non permette di evidenziare CNV e riarrangiamenti genomici nelle regioni target esaminate.

Il Direttore di Laboratorio CRIMM

Prof. AM Vannucchi