

# MiSeqDx<sup>®</sup>-instrument for instrumenter med dobbeltoppstart-konfigurasjon

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK

Katalognr. DX-410-1001

## Tiltenkt bruk

Illumina MiSeqDx er et sekvenseringsinstrument som måler fluorescenssignalene til merkede nukleotider ved bruk av instrumentspesifikke reagenser og strømningsceller (MiSeqDx-universalsett 1.0), avbildningsutstyr og programvare for dataanalyse. MiSeqDx-plattformen skal brukes til målrettet sekvensering av humant genomisk DNA fra en prøve med perifert fullblod. MiSeqDx-plattformen skal ikke brukes til helgenom- eller de novo-sekvensering.

## Prosedyreprinsipper

Illumina MiSeqDx skal brukes til målrettet resekvensering av humant genomisk DNA fra perifere fullblodprøver ved hjelp av Illumina-levert forbruksmateriale. Det genomiske DNA-et behandles via klargjøringstrinnene for biblioteket, som spesifikt amplifiserer de tiltenkte genomiske områdene på hver prøve ved bruk av tilpassede oligonukleotider som er utformet av brukeren, mens det også tilføyer indekser og strømningscelle-innfangingssekvenser til de amplifiserte produktene. Klargjøring av bibliotek består av fire hovedtrinn: hybridisering, ekstensjonsligasjon, PCR -amplifikasjon og biblioteknormalisering. De resulterende normaliserte prøvebibliotekene er klare for sekvensering på Illumina MiSeqDx-instrumentet med SBS -kjemi (sekvensering med syntese). SBS-kjemi bruker en reversibel terminator metode for å detektere enkle nukleotidebaser idet de blir inkorporert i voksende DNA-strenger. Programvaren for sanntidsanalyse (RTA) utfører bildeanalyse og basebetegnelse, i tillegg til at den tildeler en kvalitetsscore for hver base for hver sekvenseringssyklus. Når den primære analysen er utført, behandler MiSeq Reporter-programvaren på MiSeqDx-instrumentet basebetegnelsene med sekundæranalyse, som inkluderer demultipleksing, FASTQ-filgenerering, innretting, variantbetegnelse og generering av VCF (filer) som inneholder informasjon om varianter som ble funnet ved spesifikke posisjoner i et referansegenom.

## Prosedyremessige begrensninger

- 1 Til *in vitro*-diagnostisk bruk.
- 2 Dette produktet er begrenset til å levere:
  - Sekvenseringsutgang >1 Gb
  - Avleser >3 millioner
  - Avlesingslengde (i parvis endekjøring) 2 x 150 bp
  - Baser høyere enn Q30 >75 % (mer enn 75 % av basene har en kvalitetsscore på Phred-skalaen som er høyere enn 30, noe som indikerer en nøyaktighet av basebetegnelse på mer enn 99,9 %)
- 3 Varianter i homopolymerkjøringer som overstiger åtte baser, filtreres ut i VCF-filene (R8-filter).
- 4 Systemet har blitt validert for detektering av SNV og opptil 3 baseslettinger. Evaluering av 1-bases innsetninger har blitt begrenset til 3 ulike innsetninger på 3 separate kromosomer.
- 5 Systemet har problemer med å detektere 1-bases innsetninger eller slettinger i homopolymerspor (for eksempel polyA).
- 6 MiSeqDx-systemet er designet for å levere kvalitative resultater (dvs. genotype).
- 7 Som ved alle hybridiseringsbaserte arbeidsprosesser kan underliggende polymorfismer eller mutasjoner, innsetninger eller slettinger i oligonukleotidbindende områder påvirke allelene som sonderes, og derfor også betegnelsene som utføres.
- 8 Anbefalt minimal dekning per amplicon som kreves for nøyaktig variantbetegnelse (Q(max\_gt | poly\_site) >= 100), er 75x.

## Produktkomponenter

Illumina MiSeqDx omfatter:

- MiSeqDx-instrumentet (katalognr. DX-410-1001)

Følgende programvarekomponenter kreves til MiSeqDx-instrumentets drift og dataanalyse:

Programvareapplikasjon	Funksjon	Beskrivelse
MOS – MiSeqDx Operating Software	Kontrollerer instrumentbetjening	MOS-programvaren styrer betjeningen av instrumentet under sekvensering og genererer bilder til bruk med programvaren for sanntidsanalyse (RTA).
RTA – programvare for sanntidsanalyse	Utfører primære analyser	RTA-programvaren konverterer bildene generert av MOS for hver plate per syklus av sekvenseringskjøringen til basebetegnelsesfiler som er innganger for MiSeq Reporter-programvaren. RTA-programvaren inneholder ikke et brukergrensesnitt.
MiSeq Reporter	Utfører sekundæranalyse	MiSeq Reporter-programvaren behandler basebetegnelser med sekundær analyse, som inkluderer demultipleksing, FASTQ-filgenerering, innretting, variantbetegnelse og generering av VCF-filer som inneholder informasjon om varianter som finnes ved spesifikke posisjoner i et referansegenom.

## Oppbevaring og håndtering

Element	Spesifikasjon
Temperatur	Transport og oppbevaring: -10 °C til 40 °C Driftsbetingelser: 19 °C til 25 °C
Luftfuktighet	Transport og oppbevaring: Ikke-kondenserende luftfuktighet Driftsbetingelser: 30–75 % relativ luftfuktighet (ikke-kondenserende)

## Utstyr og materiell som er påkrevd, men som ikke følger med

Forbruksmateriell til sekvensering

MiSeqDx-universalsett 1.0 (katalognr. DX-103-1001)

Forbruksmateriell skaffet av brukeren

Sørg for at følgende brukeranskaffet forbruksmateriell er tilgjengelig før du starter en kjøring.

Forbruksmateriale	Formål
Spritkluter, 70 % isopropyl eller etanol, 70 %	Rengjøring av strømningscelleholderen
Laboratorieklut, lavt loinnhold	Rengjøring av strømningscellestadium
Linsepapir, 10 x 15 cm.	Rengjøring av strømningscellen
Tween 20	Vaske instrumentet
Pinsett, firkantet spiss i plast (ekstrautstyr)	Fjerne strømningscelle fra strømningscellens transportbeholder
Vann, laboratorie kvalitet	Vaske instrumentet

## Retningslinjer for vann av laboratoriekvalitet

Bruk alltid vann av laboratoriekvalitet til å utføre instrumentprosedyrer. Vann fra kranen skal aldri brukes.

Alle følgende eksempler er godkjent:

- Illumina PW1
- 18 Megaohm (MΩ) vann
- Milli-Q-vann
- Super-Q-vann
- Vann av molekylærbiologiskvalitet

## Advarsler og forholdsregler



### FORSIKTIG

Føderal lov begrenser denne enheten til salg av, eller på bestilling av, en lege eller annet fagpersonell, lovmessig lisensiert i staten vedkommende praktiserer, for å bruke eller pålegge bruk av enheten.

- 1 **Enkelte komponenter fra Illumina-leverte reagenser som skal brukes med MiSeqDx-instrumentet, inneholder potensielt farlige kjemikalier. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk verneutstyr, inkludert vernebriller, hansker og laboratoriefrakk som er egnet ved risiko for eksponering. Brukte reagenser skal behandles som kjemisk avfall og kastes i samsvar med gjeldende regionale, nasjonale og lokale lover og forskrifter.** Hvis du ønsker ytterligere informasjon om helse, miljø og sikkerhet, kan du se [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html). (Se de respektive produktvedleggene for mer informasjon.)
- 2 Enkelte komponenter i Illumina-leverte reagenssett inneholder 2-merkapttoetanol, et reduksjonsmiddel. (Se de respektive produktvedleggene for mer informasjon.) Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Brukes i et godt ventilert område og eventuelle beholdere og ubrukt innhold skal kasseres i samsvar med gjeldende lokale, statlige sikkerhetsstandarder. For mer informasjon, kontakt Illuminas tekniske støtte.
- 3 Håndter alle prøver som om de er potensielt smittefarlige stoffer.
- 4 Hvis du unnlater å følge prosedyrene som beskrevet, kan det resultere i feil resultater eller betydelig reduksjon i prøve kvaliteten.
- 5 Bruk rutinemessige forholdsregler for laboratoriet. Ikke pipetter med munnen. Ikke spis, drikk eller røyk i tilordnede arbeidsområder. Bruk engangshansker og laboratoriefrakker når du håndterer prøver og settreagenser. Vask hendene grundig etter å ha håndtert prøvene og settreagensene.
- 6 God laboratoriepraksis og god laboratoriehigiene er påkrevd for å hindre at PCR-produkter kontaminerer reagenser, instrumentering og genomiske DNA-prøver. PCR-kontaminasjon kan medføre unøyaktige og upålitelige resultater.
- 7 For å hindre kontaminasjon må du påse at preforsterknings- og postforsterknings-områdene har sitt eget utstyr (som dråpetellere, dråpetellerspisser, vortekser og sentrifuge).
- 8 Indeks-prøvesammenkoblingen må samsvare nøyaktig med prøvearket. Misforhold mellom prøvearket og plateoppsett vil resultere i tap av positiv prøveidentifikasjon og uriktig resultatrapportering.
- 9 Under biblioteknormaliseringstrinnene i de respektive reagensproduktvedleggene, er det ekstremt kritisk å resuspendere bibliotek-pelleten. Dette er avgjørende for å oppnå klyngetetthet på MiSeqDx-strømningscellen.
- 10 Følg de spesifiserte inkubasjonstidene i biblioteknormaliseringstrinnene som beskrevet i de respektive reagenspkningsvedleggene. Feil inkubasjon kan påvirke bibliotekrepresentasjonen og klyngetettheten.
- 11 Installasjon av brukerlevert antivirusprogramvare anbefales sterkt for å beskytte datamaskinen mot virus. Se brukerhåndboken for instruksjoner om installasjon.
- 12 Ikke bruk MiSeqDx når noen av panelene fjernet. Betjening av instrumentet med noen av dekslene fjernet utgjør mulig eksponering til nettspenning eller likespenning.
- 13 Ikke berør strømningscellehylsen i strømningscellekammeret. Varmeenheten i dette kammeret fungerer mellom 22 °C og 95 °C og kan forårsake brannskade.
- 14 Instrumentet veier omtrent 57 kg og kan forårsake alvorlig skade hvis det faller ned eller behandles på feil måte.

## Prosedyremessige merknader

Gjennomløp per MiSeqDx-kjøring kan være mellom 8 til 48 prøver. Indekseringsprimerne som brukes under PCR-forsterkningen må være valgt på grunnlag av ønsket endelig prøvegjennomløp for å sikre diversitet i indekssekvensen.



### MERK

For å få maksimal gjennomløpseffektivitet må biblioteksklargjøring utføres for opptil 96 prøver, og deretter må prøvene deles inn i to sekvenseringskjøringer med maksimum 48 prøver hver.

MiSeqDx bruker en grønn LED-lampe for å sekvensere G/T-baser og en rød LED-lampe til sekvensering av A/C-baser. For hver syklus må minst én av to nukleotider i hver fargekanal avleses for å sikre riktig registrering. Det er viktig å opprettholde fargebalansen for hver base av indeksavlesingen som sekvenseres, ellers kan det oppstå registreringsfeil under sekvensering av indeksavlesingen.

Hvis det sekvenseres færre enn 48 prøver i en sekvenseringskjøring, velges de aktuelle indeksene, basert på sine sekvenser for å opprettholde fargebalansen i de grønne og røde kanalene. Som minimum må kjøringene med 8 til 48 prøver inkludere indekseringsprimerkombinasjonene som identifiseres i pakningsvedlegget for MiSeqDx-universalsett 1.0.

For å behandle mindre kjøringene på riktig måte må det være minst åtte prøver tilstede. Hvis seks unike prøver (ekskludert de positive og negative kontrollene) ikke er tilgjengelige, er det akseptabelt å fylle kjøringen med prøvereplikater eller enhver form for human genomisk DNA-prøve. Se pakningsvedlegget for MiSeqDx-universalsett 1.0 for det minimale settet med fargebalanserte indekser til bruk ved sekvenseringskjøringer med åtte prøver.

## Bruksanvisning

Følgende bruksanvisninger for MiSeqDx-instrumentet krever reagenser fra MiSeqDx-universalsett 1.0.

### Klargjøre prøveark i MiSeqDx

- 1 Velg **Create Worklist** (Opprett arbeidsliste) fra velkomstskjermbildet i Illumina Worklist Manager.
- 2 Velg **MiSeqDx Universal** i feltet Test Type (Testtype).
- 3 Oppgi et navn på prøvearket i feltet Worklist Name (Arbeidslistenavn).
  - Hvis den alfanumeriske strekkode-ID-en på reagenskassetten brukes som prøvearknavn, vil MiSeq Operating Software (MOS) finne prøvearket automatisk.
  - Hvis andre navn brukes for prøvearket, kan knappen **Browse** (Bla gjennom) i MiSeq Operating Software (MOS) brukes for å finne det aktuelle prøvearket.
- 4 **[Valgfritt]** Gi en beskrivelse for å identifisere kjøringen.
- 5 Sørg for at datoen stemmer overens med startdatoen på kjøringen.
- 6 Velg **Next** (Neste).

### Oppgi prøveinformasjon

- 1 Fra fanen Table (Tabell) eller Plate, oppgi følgende informasjon for hver prøvebrønn:
  - a **Sample ID** (Prøve-ID) – Oppgi en unik prøve-ID.
  - b **Index 1 and Index 2** (Indeks 1 og Indeks 2) – Angi indeksadapteren som skal brukes for hver indeksavlesing.
  - c **Manifest** – Angi navnet på manifestfilen som inneholder informasjon om prøvene i denne bestemte brønnen.
- 2 **[Valgfritt]** Hvis du vil registrere mer detaljert informasjon om prøvene, kan du oppgi et prøvenavn og beskrivelse.
- 3 **[Valgfritt]** Du kan identifisere kontroller på platen ved å velge Negative (Negativ) eller Positive (Positiv) fra nedtrekksmenyen **Control** (Kontroll).
- 4 Gå til fanen for plategrafikk og bruk alternativet **Copy to Clipboard** (Kopier til utklippstavle) eller **Print** (Skriv ut) for å ta et bilde av prøveplaten.
- 5 Velg **Finish** (Fullfør).

## Klargjøre prøver

Følgende trinn må utføres i samsvar med bruksanvisningen i pakningsvedlegget for MiSeqDx-universalsett 1.0:

- Hybridisering av oligonukleotid-pool
- Fjerning av ubundne oligonukleotider
- Ekstensjonsligasjon av bundne oligonukleotider
- PCR-forsterkning
- PCR-rengjøring
- Biblioteknormalisering
- Biblioteksammenslåing

## Klargjøre reagenskassetten

- 1 Tin MiSeqDx-reagenskassetten i et vannbad som har tilstrekkelig avionisert vann med romtemperatur til at bunndelen av reagenskassetten når opp til vannlinjen som er trykt på reagenskassetten. Ikke la vannet komme høyere enn maksimum vannlinje.
- 2 La reagenskassetten tine i vannbadet med romtemperatur i omtrent én time eller til den er fullstendig opptint.
- 3 Ta kassetten opp av vannbadet og bank den forsiktig på benken for å fjerne vann fra bunndelen av kassetten. Tørk av bunndelen av kassetten. Påse at det ikke har kommet vann på den øvre delen av reagenskassetten.

## Kontrollere reagenskassetten

- 1 Snu reagenskassetten ti ganger for å blande de tinte reagensene, og kontroller at alle posisjonene er tint.



MERK

Det er avgjørende at reagensene i kassetten er grundig tint og blandet, for å sikre tilfredsstillende sekvensering.

- 2 Kontroller reagensene i posisjon 1, 2 og 4 for å påse at de er fullt blandet og fri for bunnfall.
- 3 Bank kassetten forsiktig mot benken for å redusere luftbobler i reagensene.



MERK

MiSeqDx-sugerørene går til bunnen på hvert reservoar for å aspirere reagensene, så det er viktig at reservoarene er fri for luftbobler.

- 4 Sett reagenskassetten på is, eller sett den til side ved 2 °C til 8 °C (opp til 6 timer) til det klart til å sette opp kjøringen. For å få de beste resultatene fortsetter du direkte til innlasting av prøven og oppsetting av kjøringen.

## Klargjøre prøver for sekvensering

- 1 Fortsett med ett **DAL**-rør til sekvensering.
- 2 Hvis **DAL**-røret ble lagret i frosset tilstand, skal det tines helt og blandes ved å pipettere innholdet opp og ned.
- 3 Tilsett 6 µl av 20 pM PhiX-internkontroll i **DAL**-røret.
- 4 Pipetter opp og ned 3–5 ganger for å skylle spissen og sikre at overføringen er fullstendig.
- 5 Bland **DAL**-røret ved å vortekse røret ved topphastighet.
- 6 Sentrifuger **DAL**-røret ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 7 Inkuber **DAL**-røret på en varmeblokk ved 96 °C i 2 minutter.
- 8 Etter inkubasjonen inverteres **DAL**-røret 1–2 ganger for blanding før det settes umiddelbart i isvann.
- 9 La **DAL**-røret stå i isvann i 5 minutter.



MERK

Utfør varmedenatureringstrinnet umiddelbart før innlasting av **DAL**-røret i MiSeqDx-reagenskassetten for å sikre effektiv malinnsetting på MiSeqDx-strømningscellen.

## Laste inn prøvebiblioteker på kassetten

- 1 Bruk en separat, ren og tom 1 ml dråpetellerspiss til å gjennomhulle folieforseglingen over reservoaret på reagenskassetten merket **Load Samples** (Last inn prøver).

- 2 Pipetter 600 µl av **DAL**-prøvebibliotekene til beholderen merket **Load Samples** (Last inn prøver). Unngå å ta på folieforseglingen.
- 3 Sjekk for luftbobler i reservoaret etter at prøven er lastet inn. Hvis luftbobler er tilstede, banker du kassetten forsiktig mot benken for å frigjøre boblene.
- 4 Gå direkte til kjøringssoppsett-trinnene ved hjelp av MiSeq Operating Software (MOS)-grensesnittet.

### Kjøringssoppsett

- 1 Logg deg på MiSeq Operating Software (MOS).
- 2 Velg **Sequence** (Sekvens).  
En rekke skjermbilder for kjøringssoppsett åpnes i følgende rekkefølge: (Velg kjøringstype), Load Flow Cell (Last inn strømningscelle), Load Reagents (Last inn reagenser), Review (Gjennomgang) og Pre-Run Check (Før kjøring-kontroll).
- 3 Når skjermbildet Load Flow Cell (Sett inn strømningscelle) vises, skal strømningscellen rengjøres og lastes inn.
- 4 Lukk strømningscellesperren og døren til strømningscellekammeret.  
Både sperren og kammerdøren skal være lukket før kjøringen begynner. Når strømningscellen er satt inn, vil programvaren lese av og registrere RFID-en. En bekreftelse om at RFID var avlest vises nederst i høyre hjørne på skjermen.
- 5 Når skjermbildet Load Reagents (Last inn reagenser) vises, tømmes avfallsflasken. Flasken med MiSeqDx SBS-løsning (PR2) settes inn, deretter reagenskassetten.  
Når flasken med MiSeqDx SBS-løsningen (PR2) og reagenskassetten er lastet inn, vil programvaren lese av og registrere RFID-en. En bekreftelse om at RFID var avlest vises nederst i høyre hjørne på skjermen.
- 6 Velg det aktuelle prøvearket.  
Som standard vil programvaren se etter en prøvearkfil med et navn som samsvarer med strekkodetallet på reagenskassetten som er lastet inn på instrumentet.
- 7 Bekreft kjøringssinnstillingene og resultatene fra før kjøring-kontrollen.
- 8 Start kjøringen.  
Skjermbildet Sequencing (Sekvensering) åpnes når kjøringen begynner. Dette skjermbildet gir en visuell fremstilling av kjøringens fremgang, inkludert intensiteter og kvalitetsscore (Q-score).

## Resultater

Den integrerte primæranalyseprogramvaren (sanntidsanalyse [RTA]) utfører bildeanalyse og basebetegnelse, i tillegg til at den tildeler en kvalitetsscore for hver base for hver sekvenseringssyklus. Når primæranalysen er ferdig, starter MiSeq Reporter-programvaren på MiSeqDx-instrumentet sekundæranalysen, som beskrevet nedenfor.

### Demultipleksing

Demultipleksing er det første trinnet i analysen hvis prøvearket har oppført flere prøver og kjøringen har indeksavlesinger. Demultipleksing skiller data fra samlede prøver, basert på korte indekssekvenser som merker prøver fra ulike biblioteker. Hver indeksavlest sekvens sammenlignes med indekssekvensene som er spesifisert i prøvearket. Ingen kvalitetsverdier vurderes på dette trinnet.

### FASTQ-filgenerering

Etter demultipleksing genererer MiSeq Reporter mellomliggende filer i FASTQ-formatet, som er et tekstformat som brukes til å representere sekvenser. FASTQ-filer inneholder avlesingene for hver prøve og kvalitetsscorene, uten avlesinger fra eventuelle clusterer som ikke passerer filteret. Kvalitetsscore Q beregnes som  $-10 \log_{10} P$ , der P er sannsynligheten for at basebetegnelsen er feil.

### Innretting

Innretting sammenligner sekvenser mot referansen for å identifisere et forhold mellom sekvenser og tildeler en score basert på likhetsområder. Innrettede avlesinger skrives til filer i BAM-format. Til MiSeqDx-universalsett 1.0 bruker

MiSeq Reporter er en bundet Smith-Waterman-algoritme som utfører lokale sekvensinnrettinger for å bestemme lignende regioner mellom to sekvenser.

### Variantbetegnelse

Til MiSeqDx-universalsett 1.0 bruker MiSeq Reporter en Starling-variantbetegnelse som betegner SNP-er og små indeler, samt oppsummerer dybde og sannsynlighet for hvert område i genomet. Starling produserer html-formaterte rapporter for SNP-er og indeler og tabulatoravgrensede tekstfiler som inneholder varianter i variantbetegnelseformatet (VCF). Hvis du ønsker informasjon om hvordan resultater kan beregnes fra VCF-filer, kan du se *Brukerveiledning for MiSeq Reporter (dokumentnr. 15039188)*.

## Ytelseskarakteristikker

### Nøyaktighet

Tre separate studier ble utført for å vurdere nøyaktigheten av MiSeqDx-plattformen.

#### Studie 1

Denne studien brukte en representativ analyse, utarbeidet for å utforske en rekke gener som dekker 24 434 baser over 19 ulike kromosomer og inneholder potensielt klinisk relevante eksoner. De 13 unike prøvene som brukes i denne studien kommer fra to foreldre og 11 barn som har blitt sekvensiert ofte av flere laboratorier og sekvenseringsmetoder. Det foreligger seks prøver fra kvinner og sju fra menn. Nøyaktigheten ble fastslått for enkle nukleotidevarianter (SNV) ved å sammenligne studiedata med en godt karakterisert referansedatabase. Referansedatabase-sekvensen ble avledet av kombinasjonen av flere sekvenseringsmetoder, offentlig tilgjengelige data og arvelighetsinformasjon. Følgende tabell for evaluering av nøyaktigheten i systemet var sammensatt fra data fra den første kjøringen i studien. Ingen repetisjonstesting ble utført for denne studien.

Resultatene fra denne studien er beskrevet nedenfor.

Tabell 1 Nøyaktighetsdata for PCR-produktnivå for MiSeqDx-plattformen fra studie 1

Amplikon	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall unike prøver	Totalt antall analyserte prøver <sup>2</sup>	Antall betegnelser per prøve som kan utføres <sup>3</sup>	Antall ingen betegnelser <sup>4</sup>	Antall riktige betegnelser per prøve <sup>5</sup>	Antall feil betegnelser <sup>6</sup>	% riktige betegnelser <sup>7</sup>
1	1	132	Poly C (5), 63 % GC	13	15	132	0	132	0	100
2	1	128	Poly T (5)	13	15	128	0	128	0	100
3	2	133	–	13	15	133	0	133	0	100
4	2	119	–	13	15	119	0	119	0	100
5	2	127	Poly T (5)	13	15	127	0	127	0	100
6	2	135	Poly A (6)	13	15	135	0	135	0	100
7	2	122	Poly T (5), Poly C (5)	13	15	122	0	122	0	100
8	2	110	Poly T (5)	13	15	110	0	110	0	100
9 <sup>8</sup>	2	131	Poly A (14)	13	15	130–131	0	130–131	9	99,54
10	2	117	–	13	15	117	0	117	0	100
11	2	121	–	13	15	121	0	121	0	100
12	2	114	–	13	15	114	0	114	0	100
13	2	129	Poly A (5)	13	15	129	0	129	0	100
14	3	131	Poly A (5), Poly T (5)	13	15	131	0	131	0	100
15	3	130	–	13	15	130	0	130	0	100
16	3	130	–	13	15	130	0	130	0	100
17	3	117	–	13	15	117	0	117	0	100



Amplikon	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall unike prøver	Totalt antall analyserte prøver <sup>2</sup>	Antall betegnelser per prøve som kan utføres <sup>3</sup>	Antall ingen betegnelser <sup>4</sup>	Antall riktige betegnelser per prøve <sup>5</sup>	Antall feil betegnelser <sup>6</sup>	% riktige betegnelser <sup>7</sup>
18	3	136	Poly T (5)	13	15	136	0	136	0	100
19	3	131	Poly T (5), SNV	13	15	131	0	131	0	100
20	3	123	Poly A (5)	13	15	123	0	123	0	100
21	3	117	Poly A (6), Poly T (5), Homologt område på et annet kromosom	13	15	117	0	117	0	100
22	3	119	Homologt område på et annet kromosom	13	15	119	0	119	0	100
23	3	120	–	13	15	120	0	120	0	100
24	3	129	Poly T (5)	13	15	129	0	129	0	100
25	4	133	Poly C (7), 66 % GC	13	15	133	0	133	0	100
26	4	135	Poly C (5), 69 % GC	13	15	135	0	135	0	100
27	4	123	SNV	13	15	123	0	123	0	100
28	4	134	–	13	15	134	0	134	0	100
29	4	132	–	13	15	132	0	132	0	100
30	4	121	Poly A (5), SNV	13	15	121	0	121	0	100
31	4	125	–	13	15	125	0	125	0	100
32	4	134	Poly T (5)	13	15	134	0	134	0	100

Amplikon	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall unike prøver	Totalt antall analyserte prøver <sup>2</sup>	Antall betegnelser per prøve som kan utføres <sup>3</sup>	Antall ingen betegnelser <sup>4</sup>	Antall riktige betegnelser per prøve <sup>5</sup>	Antall feil betegnelser <sup>6</sup>	% riktige betegnelser <sup>7</sup>
33	4	118	–	13	15	118	0	118	0	100
34	4	122	Poly A (5)	13	15	122	0	122	0	100
35	4	131	–	13	15	131	0	131	0	100
36	4	133	–	13	15	133	0	133	0	100
37	4	128	Poly T (6)	13	15	128	0	128	0	100
38	4	131	–	13	15	131	0	131	0	100
39	4	129	Poly A (5), Poly T (5), SNV	13	15	129	0	129	0	100
40	4	133	Poly T (5), SNV	13	15	133	0	133	0	100
41	4	112	SNV	13	15	112	0	112	0	100
42	4	133	–	13	15	133	0	133	0	100
43	4	135	–	13	15	135	0	135	0	100
44	4	122	–	13	15	122	0	122	0	100
45	4	117	–	13	15	117	0	117	0	100
46 <sup>9</sup>	4	124	–	13	15	125	0	125	0	100
47	4	117	Poly T (5)	13	15	117	0	117	0	100
48	4	128	Poly A (7)	13	15	128	0	128	0	100
49	4	123	Poly A (6)	13	15	123	0	123	0	100
50	4	133	–	13	15	133	0	133	0	100

Amplikon	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall unike prøver	Totalt antall analyserte prøver <sup>2</sup>	Antall betegnelser per prøve som kan utføres <sup>3</sup>	Antall ingen betegnelser <sup>4</sup>	Antall riktige betegnelser per prøve <sup>5</sup>	Antall feil betegnelser <sup>6</sup>	% riktige betegnelser <sup>7</sup>
51	4	112	–	13	15	112	0	112	0	100
52	4	129	–	13	15	129	0	129	0	100
53	4	126	–	13	15	126	0	126	0	100
54	4	132	–	13	15	132	0	132	0	100
55	5	131	–	13	15	131	0	131	0	100
56	5	119	–	13	15	119	0	119	0	100
57	5	120	Poly A (5)	13	15	120	0	120	0	100
58	5	119	–	13	15	119	0	119	0	100
59	5	118	–	13	15	118	0	118	0	100
60	5	112	–	13	15	112	0	112	0	100
61	5	120	–	13	15	120	0	120	0	100
62	5	120	Poly A (5)	13	15	120	0	120	0	100
63	5	115	CT(5)	13	15	115	0	115	0	100
64	5	112	SNV	13	15	112	0	112	0	100
65	5	135	Poly T (6)	13	15	135	0	135	0	100
66	5	131	63 % GC	13	15	131	0	131	0	100
67	5	121	–	13	15	121	0	121	0	100
68	5	132	Poly A (6), Poly T (8)	13	15	132	0	132	0	100
69	7	133	–	13	15	133	0	133	0	100

Amplikon	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall unike prøver	Totalt antall analyserte prøver <sup>2</sup>	Antall betegnelser per prøve som kan utføres <sup>3</sup>	Antall ingen betegnelser <sup>4</sup>	Antall riktige betegnelser per prøve <sup>5</sup>	Antall feil betegnelser <sup>6</sup>	% riktige betegnelser <sup>7</sup>
70	7	120	60 % GC	13	15	120	0	120	0	100
71	7	135	–	13	15	135	0	135	0	100
72	7	126	Poly A (5), 59 % GC	13	15	126	0	126	0	100
73	7	134	–	13	15	134	0	134	0	100
74	7	122	Poly C (5), 63 % GC	13	15	122	0	122	0	100
75	7	127	59 % GC, SNV	13	15	127	0	127	0	100
76	7	123	–	13	15	123	0	123	0	100
77	7	125	–	13	15	125	0	125	0	100
78	7	133	Poly A (5), Poly T (5)	13	15	133	0	133	0	100
79	7	116	–	13	15	116	0	116	0	100
80	7	135	–	13	15	135	0	135	0	100
81	7	118	–	13	15	118	0	118	0	100
82	7	136	67 % GC	13	15	136	0	136	0	100
83	7	131	58 % GC	13	15	131	0	131	0	100
84	7	119	Poly G (6), 61 % GC	13	15	119	0	119	0	100
85	7	122	Poly T (5)	13	15	122	0	122	0	100
86	7	123	Poly A (6)	13	15	123	0	123	0	100

Amplikon	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall unike prøver	Totalt antall analyserte prøver <sup>2</sup>	Antall betegnelser per prøve som kan utføres <sup>3</sup>	Antall ingen betegnelser <sup>4</sup>	Antall riktige betegnelser per prøve <sup>5</sup>	Antall feil betegnelser <sup>6</sup>	% riktige betegnelser <sup>7</sup>
87	8	127	60 % GC	13	15	127	0	127	0	100
88	8	129	57 % GC	13	15	129	0	129	0	100
89	9	130	Poly T (5)	13	15	130	0	130	0	100
90	9	116	–	13	15	116	0	116	0	100
91	9	119	Homologt område på et annet kromosom	13	15	119	0	119	0	100
92	9	121	–	13	15	121	0	121	0	100
93	9	117	Homologt område på et annet kromosom	13	15	117	0	117	0	100
94	9	114	–	13	15	114	0	114	0	100
95 <sup>10</sup>	9	129	Poly A (14)	13	15	130	0	129 (av 130)	15	99,23
96	9	114	Homologt område på et annet kromosom, SNV	13	15	114	0	114	0	100
97	9	122	–	13	15	122	0	122	0	100
98	9	127	Poly A (5), Poly C (5)	13	15	127	0	127	0	100
99	9	133	–	13	15	133	0	133	0	100
100	9	138	64 % GC	13	15	138	0	138	0	100
101	9	139	–	13	15	139	0	139	0	100
102	9	116	–	13	15	116	0	116	0	100

Amplikon	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall unike prøver	Totalt antall analyserte prøver <sup>2</sup>	Antall betegnelser per prøve som kan utføres <sup>3</sup>	Antall ingen betegnelser <sup>4</sup>	Antall riktige betegnelser per prøve <sup>5</sup>	Antall feil betegnelser <sup>6</sup>	% riktige betegnelser <sup>7</sup>
103	9	133	Poly A (5), 57 % GC	13	15	133	0	133	0	100
104	9	138	57 % GC	13	15	138	0	138	0	100
105	9	136	Poly C (5), 67 % GC	13	15	136	0	136	0	100
106	9	118	70 % GC	13	15	118	0	118	0	100
107	10	128	62 % GC	13	15	128	0	128	0	100
108	10	120	60 % GC	13	15	120	0	120	0	100
109	10	139	58 % GC, SNV	13	15	139	0	139	0	100
110	10	118	57 % GC	13	15	118	0	118	0	100
111	10	123	Poly T (5)	13	15	123	0	123	0	100
112	10	121	–	13	15	121	0	121	0	100
113	10	129	26 % GC	13	15	129	0	129	0	100
114	10	122	–	13	15	122	0	122	0	100
115	10	124	Poly T (5), Homologt område på et annet kromosom	13	15	124	0	124	0	100
116	10	135	CA(4)	13	15	135	0	135	0	100
117	10	135	Poly A (6), Homologt område på et annet kromosom	13	15	135	0	135	0	100

Amplikon	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall unike prøver	Totalt antall analyserte prøver <sup>2</sup>	Antall betegnelser per prøve som kan utføres <sup>3</sup>	Antall ingen betegnelser <sup>4</sup>	Antall riktige betegnelser per prøve <sup>5</sup>	Antall feil betegnelser <sup>6</sup>	% riktige betegnelser <sup>7</sup>
118	10	119	Poly C (5), SNV	13	15	119	0	119	0	100
119	10	125	–	13	15	125	0	125	0	100
120	10	131	–	13	15	131	0	131	0	100
121	10	117	–	13	15	117	0	117	0	100
122	10	116	–	13	15	116	0	116	0	100
123	10	129	58 % GC	13	15	129	0	129	0	100
124	11	117	Poly T (10)	13	15	117	0	117	0	100
125	11	117	Poly T (5)	13	15	117	0	117	0	100
126	11	113	Poly A (5)	13	15	113	0	113	0	100
127	11	129	–	13	15	129	0	129	0	100
128	11	121	Poly T (5)	13	15	121	0	121	0	100
129	11	123	–	13	15	123	0	123	0	100
130	11	127	Poly A (6)	13	15	127	0	127	0	100
131	11	136	Poly T (6)	13	15	136	0	136	0	100
132	11	132	Poly T (5)	13	15	132	0	132	0	100
133	11	115	–	13	15	115	0	115	0	100
134	11	117	Poly T (8), 19 % GC	13	15	117	0	117	0	100
135	11	134	Poly A (5), Poly T (5)	13	15	134	0	134	0	100

Amplikon	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall unike prøver	Totalt antall analyserte prøver <sup>2</sup>	Antall betegnelser per prøve som kan utføres <sup>3</sup>	Antall ingen betegnelser <sup>4</sup>	Antall riktige betegnelser per prøve <sup>5</sup>	Antall feil betegnelser <sup>6</sup>	% riktige betegnelser <sup>7</sup>
136	11	131	Poly A (5)	13	15	131	0	131	0	100
137	11	133	26 % GC, SNV	13	15	133	0	133	0	100
138	11	137	Poly T (8), SNV	13	15	137	0	137	0	100
139	11	131	Poly A (5)	13	15	131	0	131	0	100
140	12	131	–	13	15	131	0	131	0	100
141	12	128	–	13	15	128	0	128	0	100
142	12	133	Poly A (5)	13	15	133	0	133	0	100
143	12	136	–	13	15	136	0	136	0	100
144	12	124	–	13	15	124	0	124	0	100
145	12	122	59 % GC	13	15	122	0	122	0	100
146	13	122	–	13	15	122	0	122	0	100
147	13	116	Poly C (5)	13	15	116	0	116	0	100
148	13	133	–	13	15	133	0	133	0	100
149	13	117	SNV	13	15	117	0	117	0	100
150	13	124	Poly T (6)	13	15	124	0	124	0	100
151	13	123	Poly T (5), 26 % GC	13	15	123	0	123	0	100
152	13	115	Poly A (5)	13	15	115	0	115	0	100
153	13	125	–	13	15	125	0	125	0	100



Amplikon	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall unike prøver	Totalt antall analyserte prøver <sup>2</sup>	Antall betegnelser per prøve som kan utføres <sup>3</sup>	Antall ingen betegnelser <sup>4</sup>	Antall riktige betegnelser per prøve <sup>5</sup>	Antall feil betegnelser <sup>6</sup>	% riktige betegnelser <sup>7</sup>
154	13	121	–	13	15	121	0	121	0	100
155	13	123	–	13	15	123	0	123	0	100
156	13	114	–	13	15	114	0	114	0	100
157	13	119	–	13	15	119	0	119	0	100
158	14	122	58 % GC	13	15	122	0	122	0	100
159	16	122	–	13	15	122	0	122	0	100
160	16	121	–	13	15	121	0	121	0	100
161	16	123	Poly C (5)	13	15	123	0	123	0	100
162	17	119	–	13	15	119	0	119	0	100
163	17	119	61 % GC	13	15	119	0	119	0	100
164	17	135	–	13	15	135	0	135	0	100
165	17	116	Poly C (6), 60 % GC, SNV	13	15	116	0	116	0	100
166	17	123	–	13	15	123	0	123	0	100
167	17	116	62 % GC	13	15	116	0	116	0	100
168	17	118	Poly C (5), 65 % GC	13	15	118	0	118	0	100
169	17	129	–	13	15	129	0	129	0	100
170	17	131	Poly G (6), 67 % GC, SNV	13	15	131	0	131	0	100

Amplikon	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall unike prøver	Totalt antall analyserte prøver <sup>2</sup>	Antall betegnelser per prøve som kan utføres <sup>3</sup>	Antall ingen betegnelser <sup>4</sup>	Antall riktige betegnelser per prøve <sup>5</sup>	Antall feil betegnelser <sup>6</sup>	% riktige betegnelser <sup>7</sup>
171	17	127	61 % GC	13	15	127	0	127	0	100
172	17	118	Poly C (5)	13	15	118	0	118	0	100
173	17	138	61 % GC	13	15	138	0	138	0	100
174	17	131	58 % GC	13	15	131	0	131	0	100
175	18	112	–	13	15	112	0	112	0	100
176	18	124	–	13	15	124	0	124	0	100
177	18	134	Poly A (6)	13	15	134	0	134	0	100
178	18	129	–	13	15	129	0	129	0	100
179	18	133	–	13	15	133	0	133	0	100
180	18	118	–	13	15	118	0	118	0	100
181	18	114	60 % GC	13	15	114	0	114	0	100
182	18	118	–	13	15	118	0	118	0	100
183	19	122	Poly G (6), 66 % GC	13	15	122	0	122	0	100
184	19	139	64 % GC	13	15	139	0	139	0	100
185	19	131	67 % GC	13	15	131	0	131	0	100
186	19	141	59 % GC, Homologt område på et annet kromosom	13	15	141	0	141	0	100

Amplikon	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall unike prøver	Totalt antall analyserte prøver <sup>2</sup>	Antall betegnelser per prøve som kan utføres <sup>3</sup>	Antall ingen betegnelser <sup>4</sup>	Antall riktige betegnelser per prøve <sup>5</sup>	Antall feil betegnelser <sup>6</sup>	% riktige betegnelser <sup>7</sup>
187	19	121	Poly C (5), 72 % GC, Homologt område på et annet kromosom	13	15	121	0	121	0	100
188	19	138	58 % GC	13	15	138	0	138	0	100
189	19	123	64 % GC	13	15	123	0	123	0	100
190	19	138	–	13	15	138	0	138	0	100
191	20	117	Poly T (5)	13	15	117	0	117	0	100
192	22	136	Poly A (7)	13	15	136	0	136	0	100
193	22	122	Poly A (5), Poly C (5)	13	15	122	0	122	0	100
194	22	122	62 % GC, SNV	13	15	122	0	122	0	100
195	22	119	66 % GC	13	15	119	0	119	0	100

<sup>1</sup> Analysert fragment betyr størrelsen på det sekvenserte genomiske området i baser, ikke inkludert målspesifikke primere.

<sup>2</sup> Totalt antall oppførte prøver er 15, fordi to av de 13 unike prøvene som var analysert, var kjørt i to uavhengige replikater.

<sup>3</sup> Antall betegnelser/prøver som kunne gjøres er antallet baser som hadde tilstrekkelig kvalitet til å bli betegnet av systemet.

<sup>4</sup> Antallet ingen betegnelser er antallet baser i et amplikon som resulterer i en ingen betegnelse i kjøringen.

<sup>5</sup> Antallet riktige betegnelser per prøve er antallet betegnede baser i amplikonet som hadde resultater som samsvarte med referansesekvensen for det humane genomet, bygg 19, og den godt karakteriserte sammensatte referansen.

<sup>6</sup> Antallet uriktige betegnelser var det totale antallet uriktige betegnelser for SNV eller indel i dette amplikonet. Ytterligere detaljer om feil betegnelser er beskrevet i fotnotene nedenfor.

<sup>7</sup> Prosenttallet for riktige betegnelser er likt den riktige betegnelsesfrekvensen for alle basene i amplikonet, der den riktige betegnelsen for SNV eller indel er basert på den godt karakteriserte sammensatte referanseinformasjonen, og den riktige betegnelsen for baser i gjenværende amplikonsekvens er basert på sammenligning med referansesekvensen for humant genom, bygg 19. Denne kolonnen kan ha mer enn ett forventet resultat for et gitt amplikon hvis noen prøver inneholder en indel, mens andre ikke gjør det, det vil si amplikon 9. Prosenttallet for riktige betegnelser for prøvene med feil resultat vises i tabellen.

<sup>8</sup> Amplikon 9 har en homopolymerkjøring på 14 A-er i henhold til referansesekvens bygg 19 for humant genom. Den godt karakteriserte sammensatte referanseinformasjonen for 7 av 13 prøver har imidlertid 13 A-er i denne homopolymerkjøringen. I disse sju prøvene representerer sletting av dette ene baseparet en falsk negativ i MiSeqDx-sekvenseringsnøyaktighetsstudien.

<sup>9</sup> Amplikon 46 har en én baseinnsetting som er rapportert i ni prøver i den godt karakteriserte referansedatabasen og er riktig detektert i alle analyserte prøver.

<sup>10</sup> Amplikon 95 har en homopolymerkjøring på 14 A-er i henhold til referansesekvens bygg 19 for humant genom. Den godt karakteriserte sammensatte referansesekvensen for 13 av 13 prøver har 15 A-er i denne homopolymerkjøringen. I disse 13 prøvene er denne ene parinnsettingen en falsk negativ i MiSeqDx-sekvenseringsnøyaktighetsstudien.

Følgende tabell inneholder data fra studie 1, vist med positivt og negativt prosentsamsvar, der variantresultatene er sammenlignet med den godt karakteriserte sammensatte referanseinformasjonen for PPA-beregninger. Siden den sammensatte referanseinformasjonen kun gir resultater for de enkle nukleotidevariantene og innsetninger/slettinger, er resultatet for ikke-variantbase sammenlignet med referansesekvensen for humant genom, bygg 19, for NPA-beregninger. Alle ikke-variantbaser hadde 100 % samsvar med referansesekvensen. Alle SNV-er hadde 100 % samsvar med referansesekvensen. Varianter som manglet, var enten 1 baseinnsettinger eller 1 baseslettinger i homopolymerområder.

**Tabell 2** Samsvar av MiSeqDx-plattformens basebetegnelsesresultater med referansedata for 13 godt karakteriserte prøver

Prøve	Antall ampliconer	Prosentvis amplikondekning <sup>1</sup>	Varianter forventet per prøve <sup>2</sup>	Varianter riktig betegnet	Varianter gått tapt <sup>3</sup>	Ikke-variantbaser betegnet riktig	PPA <sup>4</sup> (%)	NPA <sup>5</sup> (%)
NA12877	195	100	19	17	2	24418	89,47	100
NA12878	195	100	19	17	2	24417	89,47	100
NA12879	195	100	20	19	1	24416	95,00	100
NA12880	195	100	20	18	2	24417	90,00	100
NA12881	195	100	22	20	2	24415	90,91	100
NA12882	195	100	16	15	1	24419	93,75	100
NA12883	195	100	24	23	1	24412	95,83	100
NA12884	195	100	21	20	1	24415	95,24	100
NA12885	195	100	19	17	2	24417	89,47	100
NA12886	195	100	22	20	2	24415	90,91	100
NA12887	195	100	19	18	1	24416	94,74	100
NA12888	195	100	24	23	1	24412	95,83	100
NA12893	195	100	20	18	2	24417	90,00	100

<sup>1</sup> Prosent amplikondekning er antallet baser i ampliconer sekvensert med konfidens.

<sup>2</sup> Varianter forventet per prøve inkluderer både SNV-er og indeler.

<sup>3</sup> Du finner de tapte variantene i den første tabellen for studie 1 og fotnotene 8–10.

<sup>4</sup> Positivt prosentsamsvar (PPA) =  $100 \times TP / (TP + FN)$ , der de sanne positive (TP) er antallet positive variantbetegnelser på genomiske koordinater, der varianter er til stede i henhold til referansesekvensen og betegnet mutant-allele stemmer overens med referansesekvensen (kolonnen kalt «Varianter betegnet riktig»), og de falskt negative (FN) er antallet negative variantbetegnelser på genomiske koordinater, der varianter er til stede i henhold til referansesekvensen (kolonnen kalt «Varianter gått tapt»).

<sup>5</sup> Negativt prosentsamsvar (NPA) =  $100 \times TN / (FP + TN)$  der de falskt positive (FP) er antallet positive variantbetegnelser på genomiske koordinater, der varianter er fraværende i henhold til referansesekvensen, eller hvis betegnet mutant-allele ikke stemmer overens med referansesekvensen (ikke i tabellen, ingen falskt positive variantbetegnelser ble gjort i denne studien) og sanne negative (TN) er antallet negative variantbetegnelser på genomiske koordinater, der varianter er fraværende i henhold til referansesekvensen (kolonnen kalt «Ikke-variantbaser betegnet riktig»).

## Studie 2

Sekvenseringsresultatene for ampliconpanelet ovenfor ble sammenlignet med en genotype med høy konfidens, etablert for NA12878 av National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.15<sup>1</sup>). Av de 195 ampliconene var 184 ampliconer innenfor referansebetegnelsene med høy konfidens i NIST-sekvensen og ble sammenlignet. Ikke-variante basebetegnelser ble sammenlignet med referansesekvensen for humant genom, bygg 19.

**Tabell 3** Sammenligning av MiSeqDx-plattformens sekvenseringsresultater for prøve NA12878 med NIST -database

Prøve	Antall amplikoner	Prosentvis amplikondekning <sup>2</sup>	Varianter forventet	Varianter riktig betegnet	Varianter gått tapt	Ikke-variantbaser betegnet riktig	PPA <sup>3</sup> (%)	NPA <sup>4</sup> (%)
NA12878	184	100	17	16	1 <sup>5</sup>	23066	94,12	100

<sup>1</sup> Zook, JM et al. Integrating sequencing datasets to form highly confident SNP and indel genotype calls for a whole human genome. arXiv:1307.4661 [q-bio.GN].

<sup>2</sup> Prosent amplikondekning er antallet baser i amplikoner sekvensert med konfidens.

<sup>3</sup> Positivt prosentsamsvar (PPA) =  $100 \times TP / (TP + FN)$ .

<sup>4</sup> Negativt prosentsamsvar (NPA) =  $100 \times TN / (FP + TN)$ .

<sup>5</sup> Den manglende varianten er den ene baseparslettingen i amplikon 9 i homopolymerkjøringen av 14 A-er som ikke er betegnet av MiSeqDx som er til stede i NIST-sekvensen. Vær oppmerksom på at NIST-sekvensen ikke inkluderer den ene baseparinnsettingen i den andre homopolymeren av A-er som var tilstede i den andre referansedatabasen brukt ovenfor i studie 1.

### Studie 3

I en ekstra nøyaktighetsstudie som ble utført for å vurdere ytelsen til små innsetninger og slettinger i en representativ analyse, inkluderte Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant-analysen et undersett av *CFTR* klinisk signifikante genetiske variasjoner analysert med MiSeq Reporter-programvaren ved hjelp av MiSeqDx-plattformen til arbeidsflyt med målrettet DNA-sekvensering. De forespurte innsettingene og slettingene ble detektert der de var forventet med høy konfidens. Disse prøvene ble karakterisert av toveis Sanger-sekvensering som en referansemetode til oppretting av den forventede sekvensen.

**Tabell 4** Oppsummering av indeldetektering med MiSeqDx-plattformen

Amplikon	Innsettstørrelse	Amplikon-genomisk innhold	Antall betegnelser / prøver som kunne utføres	Antall betegnede baser/prøve	Antall ingen betegnelser	Antall riktige betegnelser/prøve	Antall uniktige betegnelser	Prosent riktige betegnelser
1	129	1 baseinnsetting	130	130	0	130	0	100
2	154	3 basesletting	151	151	0	151	0	100
3	167	2 basesletting	165	165	0	165	0	100
4	134	1 basesletting	133	133	0	133	0	100
5	132	1 basesletting	131	131	0	131	0	100
6	129	1 basesletting	128	128	0	128	0	100

Data fra disse nøyaktighetsstudiene støtter påstanden om at MiSeqDx-plattformen kan nøyaktig sekvensere:

- GC-innhold  $\geq 19$  % (alle baser i 135 av 135 sekvenserte amplikoner med 19 % GC-innhold riktig betegnet)
- GC-innhold  $\leq 72$  % (alle baser i 135 av 135 sekvenserte amplikoner med 72 % GC-innhold riktig betegnet)
- PolyA-lengder  $\leq 7$  (PolyA-gjentakelse av 7 nukleotider ble riktig betegnet i 270 av 270 sekvenserte amplikoner som inneholdt PolyA =7)
- PolyT-lengder  $\leq 8$  (PolyT-gjentakelse av 8 nukleotider ble riktig betegnet i 270 av 270 sekvenserte amplikoner som inneholdt PolyT =8)
- PolyG-lengder  $\leq 6$  (PolyG-gjentakelse av 6 nukleotider ble riktig betegnet i 405 av 405 sekvenserte amplikoner som inneholdt PolyG =6)
- PolyC-lengder  $\leq 7$  (PolyC-gjentakelse av 7 nukleotider ble riktig betegnet i 135 av 135 sekvenserte amplikoner som inneholdt PolyC =7)

- Dinukleotidegjentakelseslengder  $\leq 5x$  (alle baser i 135 av 135 sekvenserte amplikoner med 5x dinukleotidegjentakelse ble riktig betegnet)
- Trinukleotidegjentakelseslengder  $\leq 4x$  (alle baser i 810 av 810 sekvenserte amplikoner med 4x trinukleotidegjentakelser ble riktig betegnet)
- 1 baseinnsettinger og 3 eller færre baseslettinger
  - To av tre 1-baseinnsettinger som ble testet ble riktig betegnet. Riktige betegnelser ble gjort for to 1-baseinnsettinger i ikke-homopolymerregioner i 82 amplikoner. Én 1-baseinnsetting ble ikke betegnet i en homopolymerkjøring på 14 A-er på kromosom 2 i 135 amplikoner.
  - Tre av fire 1-baseslettinger ble riktig betegnet. Alle riktige betegnelser ble gjort i ikke-homopolymerregioner i 4 amplikoner. Én 1-basesletting ble ikke betegnet i en homopolymerkjøring på 14 A-er på kromosom 9 i 63 amplikoner.
  - 2-basesletting ble riktig betegnet i én prøve.
  - 3-baseslettinger ble riktig betegnet i 21 prøver.

## Reproduserbarhet

Reproduserbarheten for MiSeqDx-plattformen ble bestemt ved bruk av to representative analyser.

### Studie 1

En representativ analyse ble utarbeidet for å utforske en rekke gener som dekker 24 434 baser over 19 ulike kromosomer og inneholder potensielt klinisk relevante eksoner. I studien ble 13 prøver undersøkt i løpet av ni kjøringar ved hjelp av tre ulike MiSeqDx-instrumenter og tre ulike operatører (Tabell 5). Et enkelt parti med reagenser for klargjøring av biblioteket og to partier med sekvenseringsforbruksmateriell ble brukt. De 13 prøvene var fra to foreldre og 11 barn som hadde blitt sekvensiert ofte av flere laboratorier og sekvenseringsmetoder. To prøver ble kjørt i duplikat, slik at hver kjøring genererte resultater fra 15 prøver.

For evaluering av reproduserbarheten fra parti til parti ble 94 prøver og to ikke-mal-kontroller testet på tvers av tre partier. Hvert parti ble delt i to 48-prøvers kjøringar for å teste alle reagenser og mulige indeksprimerkombinasjoner. Alle sekvenseringskjøringar ble fullført av en enkelt operatør og på et enkelt MiSeqDx-instrument for å fjerne potensielle variasjoner fra operatør eller instrument (Tabell 6).

Nøyaktige betegnelser ble fastslått for enkle nukleotidevarianter (SNV) ved å sammenligne studiedata med en godt karakterisert referansedatabase. Det var ingen mislykkede kjøringar eller nye kjøringar i reproduserbarhetsstudien. Følgende tabeller viser resultatene fra studiene som evaluerte reproduserbarheten i systemet.

Tabell 5 Reproduserbarhetsresultater, instrument-til-instrument, for MiSeqDx-plattformen (PCR-produktnivå) fra studie 1

Amplikon	Kr.	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall prøver i kjøring <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>
1	1	132	Poly C (5), 63 % GC	135	0	0	100	23 <sup>6</sup>	0	99,61 <sup>7</sup>	39 <sup>6</sup>	0	99,34 <sup>7</sup>
2	1	128	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	2	133	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	2	119	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
5	2	127	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
6	2	135	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
7	2	122	Poly T (5), Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
8	2	110	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
9	2	131	Poly A (14)	135	0	27 <sup>8</sup>	99,54	0	27 <sup>8</sup>	99,54	0	27 <sup>8</sup>	99,54
10	2	117	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
11	2	121	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
12	2	114	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
13	2	129	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
14	3	131	Poly A (5), Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
15	3	130	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
16	3	130	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Kr.	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall prøver i kjøring <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>
17	3	117	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
18	3	136	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
19	3	131	Poly T (5), SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
20	3	123	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
21	3	117	Poly A (6), Poly T (5), Homologt område på et annet kromosom	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
22	3	119	Homologt område på et annet kromosom	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
23	3	120	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
24	3	129	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
25	4	133	Poly C (7), 66 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
26	4	135	Poly C (5), 69 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
27	4	123	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
28	4	134	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100



Amplikon	Kr.	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall prøver i kjøring <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>
29	4	132	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
30	4	121	Poly A (5), SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
31	4	125	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
32	4	134	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
33	4	118	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
34	4	122	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
35	4	131	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
36	4	133	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
37	4	128	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
38	4	131	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
39	4	129	Poly A (5), Poly T (5), SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
40	4	133	Poly T (5), SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
41	4	112	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
42	4	133	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
43	4	135	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
44	4	122	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Kr.	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall prøver i kjøring <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>
45	4	117	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
46	4	124	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
47	4	117	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
48	4	128	Poly A (7)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
49	4	123	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
50	4	133	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
51	4	112	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
52	4	129	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
53	4	126	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
54	4	132	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
55	5	131	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
56	5	119	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
57	5	120	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
58	5	119	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
59	5	118	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
60	5	112	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
61	5	120	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
62	5	120	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
63	5	115	CT(5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Kr.	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall prøver i kjøring <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>
64	5	112	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
65	5	135	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
66	5	131	63 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
67	5	121	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
68	5	132	Poly A (6), Poly T (8)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
69	7	133	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
70	7	120	60 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
71	7	135	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
72	7	126	Poly A (5), 59 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
73	7	134	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
74	7	122	Poly C (5), 63 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
75	7	127	59 % GC, SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
76	7	123	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
77	7	125	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
78	7	133	Poly A (5), Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
79	7	116	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Kr.	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall prøver i kjøring <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>
80	7	135	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
81	7	118	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
82	7	136	67 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
83	7	131	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
84	7	119	Poly G (6), 61 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
85	7	122	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
86	7	123	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
87	8	127	60 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
88	8	129	57 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
89	9	130	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
90	9	116	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
91	9	119	Homologt område på et annet kromosom	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
92	9	121	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
93	9	117	Homologt område på et annet kromosom	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Kr.	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall prøver i kjøring <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>
94	9	114	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
95	9	129	Poly A (14)	135	0	45 <sup>9</sup>	99,22	0	45 <sup>9</sup>	99,22	0	45 <sup>9</sup>	99,22
96	9	114	Homologt område på et annet kromosom, SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
97	9	122	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
98	9	127	Poly A (5), Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
99	9	133	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
100	9	138	64 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
101	9	139	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
102	9	116	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
103	9	133	Poly A (5), 57 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
104	9	138	57 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
105	9	136	Poly C (5), 67 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
106	9	118	70 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
107	10	128	62 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Kr.	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall prøver i kjøring <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>
108	10	120	60 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
109	10	139	58 % GC, SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
110	10	118	57 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
111	10	123	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
112	10	121	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
113	10	129	26 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
114	10	122	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
115	10	124	Poly T (5), Homologt område på et annet kromosom	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
116	10	135	CA(4)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
117	10	135	Poly A (6), Homologt område på et annet kromosom	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
118	10	119	Poly C (5), SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
119	10	125	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Kr.	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall prøver i kjøring <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>
120	10	131	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
121	10	117	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
122	10	116	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
123	10	129	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
124	11	117	Poly T (10)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
125	11	117	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
126	11	113	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
127	11	129	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
128	11	121	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
129	11	123	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
130	11	127	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
131	11	136	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
132	11	132	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
133	11	115	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
134	11	117	Poly T (8), 19 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
135	11	134	Poly A (5), Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
136	11	131	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Kr.	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall prøver i kjøring <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>
137	11	133	SNV, 26 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
138	11	137	Poly T (8), SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
139	11	131	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
140	12	131	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
141	12	128	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
142	12	133	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
143	12	136	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
144	12	124	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
145	12	122	59 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
146	13	122	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
147	13	116	Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
148	13	133	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
149	13	117	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
150	13	124	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
151	13	123	Poly T (5), 26 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
152	13	115	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
153	13	125	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100



Amplikon	Kr.	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall prøver i kjøring <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>
154	13	121	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
155	13	123	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
156	13	114	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
157	13	119	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
158	14	122	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
159	16	122	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
160	16	121	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
161	16	123	Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
162	17	119	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
163	17	119	61 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
164	17	135	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
165	17	116	Poly C (6), 60 % GC, SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
166	17	123	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
167	17	116	62 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
168	17	118	Poly C (5), 65 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
169	17	129	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Kr.	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall prøver i kjøring <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>
170	17	131	Poly G (6), 67 % GC, SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
171	17	127	61 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
172	17	118	Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
173	17	138	61 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
174	17	131	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
175	18	112	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
176	18	124	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
177	18	134	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
178	18	129	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
179	18	133	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
180	18	118	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
181	18	114	60 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
182	18	118	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
183	19	122	Poly G (6), 66 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
184	19	139	64 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
185	19	131	67 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Kr.	Analysert fragmentstørrelse <sup>1</sup>	Genomisk innhold i PCR-produkt	Antall prøver i kjøring <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>	Totalt antall betegnelser <sup>3</sup>	Totalt antall feil betegnelser <sup>4</sup>	% riktige betegnelser <sup>5</sup>
186	19	141	59 % GC, Homologt område på et annet kromosom	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
187	19	121	Poly C (5), 72 % GC, Homologt område på et annet kromosom	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
188	19	138	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
189	19	123	64 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
190	19	138	–	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
191	20	117	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
192	22	136	Poly A (7)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
193	22	122	Poly A (5), Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
194	22	122	62 % GC, SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
195	22	119	66 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

<sup>1</sup> Analysert fragment er størrelsen på det sekvenserte genomiske området i baser, ikke inkludert målspesifikke primere.

<sup>2</sup> Antallet prøver blir beregnet fra 9 kjøring av 15 prøver (11 prøver kjøres én gang og 2 prøver kjøres to ganger).

<sup>3</sup> Totalt antall ingen betegnelser er det kombinerte antallet ingen betegnelser oppnådd for alle 45 kjøring som analyserer det spesifikke amplikonet ved bruk av et bestemt MiSeqDx-instrument.

- <sup>4</sup> Totalt antall feil betegnelser er det kombinerte antallet feil betegnelser oppnådd for alle 45 kjøringene som analyserer det spesifikke ampliconet ved bruk av et spesifikt MiSeqDx-instrument.
- <sup>5</sup> % riktige betegnelser er lik den riktige betegnelsesraten for alle basene i ampliconet, der den riktige betegnelsen for SNV eller indel er basert på den godt karakteriserte referansedatabasen, og den riktige betegnelsen for baser i den gjenværende ampliconsekvensen er basert på sammenligning med referansekvens bygg 19 for humant genom. Denne kolonnen har kanskje mer enn ett forventet resultat for et gitt amplicon hvis noen prøver forventes å ha en indel og noen ikke, for eksempel amplicon 9.
- <sup>6</sup> Amplicon 1 hadde en rekke baser der genotype ikke kunne betegnes: 12 baser i 1/9 kjøringene i NA12881, 1 base i 2/9 kjøringene og 3 baser i 1/9 kjøringene i NA12886, 20 baser i 1/9 kjøringene og 26 baser i 1/9 kjøringene i NA12888. Dette skyldes lav dekning ved ingen betegnelsesbaser i disse kjøringene, der gjennomsnittlig sekvenseringsdybde var 33,2, med minimum 21 og maksimum 52.
- <sup>7</sup> Når ingen betegnelser ikke er inkludert i beregningen, er riktig betegnelsesrate 100 %.
- <sup>8</sup> Amplicon 9 har en homopolymerkjøring på 14 A-er i henhold til referansesekvens bygg 19 for humant genom. Den godt karakteriserte referanseinformasjonen for 7 av 13 prøver har imidlertid 13 A-er i denne homopolymerkjøringen. I disse sju prøvene blir denne ene baseparslettingen kalt en falsk negativ og blir kalt falsk negativ reproduserbarhet i alle ni kjøringene.
- <sup>9</sup> Amplicon 95 har en homopolymerkjøring på 14 A-er i henhold til referansesekvens bygg 19 for humant genom. Den godt karakteriserte referanseinformasjonen for 13 av 13 prøver har imidlertid 15 A-er i denne homopolymerkjøringen. I disse 13 prøvene er denne ene baseparinnsettingen 100 % reproduserbarhet ikke betegnet (den er falsk negativ).

Resultatene fra reproduserbarhetsstudie 1 for hver prøve vises sammensatt av alle ni kjøringene i én kolonne. De viste resultatene er kun for de enkle nukleotidevariantene og resultatene fra innsettinger/slettinger versus referansedatabesekvensen for tre kjøringene på tre instrumenter. Denne analysen viste at resultatene for variantene var reproduserbare på tvers av ni kjøringene for disse prøvene.

**Tabell 6** Oppsummering for MiSeqDx-plattformens reproduserbarhetsresultater for 13 godt karakteriserte prøver

DNA-nummer	DNA-prøve-ID	Antall kjøringene per prøve	Antall SNV-er	Enkle nukleotidevarianter (SNV-er)			Antall indeler	Innsettinger/slettinger (indeler)		
				Antall betegnet riktig	Antall falskt positive <sup>1</sup>	Antall falskt negative <sup>2</sup>		Antall betegnet riktig	Antall falskt positive <sup>1</sup>	Antall falskt negative <sup>2</sup>
1	NA12877 <sup>3</sup>	18	16	16	0	0	3	1	0	2
2	NA12878 <sup>3</sup>	18	17	17	0	0	2	0	0	2
3	NA12879	9	18	18	0	0	2	1	0	1
4	NA12880	9	17	17	0	0	3	1	0	2
5	NA12881	9	19	19	0	0	3	1	0	2
6	NA12882	9	15	15	0	0	1	0	0	1
7	NA12883	9	22	22	0	0	2	1	0	1
8	NA12884	9	19	19	0	0	2	1	0	1
9	NA12885	9	17	17	0	0	2	0	0	2
10	NA12886	9	19	19	0	0	3	1	0	2
11	NA12887	9	18	18	0	0	1	0	0	1
12	NA12888	9	22	22	0	0	2	1	0	1
13	NA12893	9	17	17	0	0	3	1	0	2

<sup>1</sup> Falskt positiv = Variant betegnet av MiSeqDx-sekvenseringskjøring, men ikke i referansedatabase.

<sup>2</sup> Falskt negativ = Variant i referansedatabase, men ikke betegnet i MiSeqDx-sekvenseringskjøring.

<sup>3</sup> Prøvene NA12877 og NA12878 ble kjørt i duplikat. Replikatprøvene ga identiske resultater.

## Studie 2

I en reproduserbarhetsstudie (sted-til-sted), utført med en representativ analyse, inkluderte Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139 Variant-analysen et undersett av *CFTR* klinisk signifikante genetiske variasjoner analysert med MiSeq Reporter-programvaren ved hjelp av MiSeqDx-plattformen til arbeidsflyt med målrettet

DNA-sekvensering. Den blindede studien brukte tre prøvesteder og to operatører på hvert sted. To godt karakteriserte paneler på 46 prøver hver ble testet av hver operatør på hvert sted med totalt 810 betegnelser per sted. Panelene inneholdt en blanding av genomisk DNA fra cellelinjer med kjente varianter *CFTR*-genet, i tillegg til leukocyt-utarmet blod tilsatt cellelinjer med kjente varianter i *CFTR*-genet. Blodprøvene ble gitt for å tilrettelegge inkorporering av ekstraksjonstrinnene som ble brukt til å forberede gDNA som fungerer som primæringang for analysearbeidsflyten. Prøvegjennomgangsfrekvensen, definert som antallet prøver som går gjennom QC-metrikken på første forsøk, var 99,88 %. Alle testresultater er basert på innledende testing.

Tabell 7 Oppsummering av resultater fra reproducerbarhetsstudien utført med en representativ MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant-analyse

Panel	Prøvenummer	Prøvegenotype	Varianter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarsbetegnelser (varianter)			Negative samsvarsbetegnelser (villtype)			Antall feil betegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4 <sup>1</sup>	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 <sup>1</sup>	100	100	100
A	5 <sup>2</sup>	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9 <sup>3</sup>	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92
A	10 <sup>3</sup>	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Prøvenummer	Prøvegenotype	Varianter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarsbetegnelser (varianter)			Negative samsvarsbetegnelser (villtype)			Antall feil betegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C ikke tilstede	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Prøvenummer	Prøvegenotype	Varianter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarsbetegnelser (varianter)			Negative samsvarsbetegnelser (villtype)			Antall feil betegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100



Panel	Prøvenummer	Prøvegenotype	Varianter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarsbetegnelser (varianter)			Negative samsvarsbetegnelser (villtype)			Antall feil betegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delITT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	59	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Prøvenummer	Prøvegenotype	Varianter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarsbetegnelser (varianter)			Negative samsvarsbetegnelser (villtype)			Antall feil betegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 <sup>4</sup>	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75 <sup>2</sup>	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Prøvenummer	Prøvegenotype	Varianter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarsbetegnelser (varianter)			Negative samsvarsbetegnelser (villtype)			Antall feil betegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 <sup>4</sup>	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Total				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

- <sup>1</sup> Villtypeplasseringen som tilsvarer N1303K-varianten for ett replikat, resulterte i en Ingen betegnelse på grunn av utilstrekkelig dekning.
- <sup>2</sup> Ett replikat av prøvene 5 og 75 hadde 0 % betegnelsesfrekvens. Ytterligere undersøkelse angir at prøvene kanskje ikke har vært tilsatt prøveplaten før klargjøringen av biblioteket, fordi de gjenværende prøvevolumene i rørene var i samsvar med ingen volum som var fjernet.
- <sup>3</sup> Bevis angir at prøvene 9 og 10 sannsynligvis ble byttet om av operatøren før biblioteket var klargjort.
- <sup>4</sup> Villtypeplasseringen som tilsvarer M1V-varianten for ett replikat av hver av to prøver, resulterte i ingen betegnelse på grunn av utilstrekkelig dekning.

## DNA-ekstraksjon

Tre ulike ekstraksjonsmetoder, magnetkuleekstraksjon, alkoholutfelling og kvartfilter-kolonneisolasjon ble evaluert med K<sub>2</sub>EDTA antikoagulert fullblod. Fjorten unike blodprøver ble brukt i studien, og representerer en genotypebredde fra ett representativt gen. De tre DNA-ekstraksjonsmetodene ble testet uavhengig av to ulike operatører som hver utførte tre kjøring per ekstraksjonsmetode. Hver ekstraksjon ble utført av hver operatør på ulike dager. DNA-konsentrasjonen og A260/A280-forholdet i de ekstraherte gDNA-prøvene ble bestemt med spektrofotometri. Den totale prøvestørrelsen for hver ekstraksjonsmetode i denne studien var 168 (14 prøver x 2 operatører/ekstraksjonsmetode x 3 kjøring/operatør x 2 replikater / ekstrahert gDNA-prøve).

Ekstraksjonsmetode	Antall prøver som ble testet	Betegnelsesfrekvens	Nøyaktighet <sup>1</sup>	Prøvens første gjennomgangshastighet <sup>2</sup>
Alkoholutfelling	168	100 %	100 %	100 %
Kvartfilter kolonneisolasjon	168	100 %	100 %	100 %
Magnetkuleekstraksjon	168	100 %	100 %	100 %

<sup>1</sup> Nøyaktighet – prosentensamsvaret med en referansetestmetode (toveis sekvensering med Sanger) beregnet for de baseposisjonene som mottar en basebetegnelse.

<sup>2</sup> Prøvens første gjennomgangshastighet – antallet prøver som oppfyller den angitte betegnelseshastigheten første gang de behandles (dvs. uten behov for ny kjøring eller ekstra behandling) som en prosentverdi av det totale antallet prøver kjørt i et enkelt MiSeqDx-sekvenseringseksperiment.

## DNA-inngang

Inngangsområdet for DNA for MiSeqDx-plattformen ble evaluert ved å utføre en seriell fortynningsstudie med 14 representative DNA-prøver som inneholdt 16 unike genvarianter. Hver prøve ble testet i duplikat på ni DNA-inngangsnivåer fra 1250 ng til 1 ng (1250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng og 1 ng). For å bestemme nøyaktigheter ble prøvegenotypene sammenlignet med toveis Sanger-sekvenseringsdata. 1250 ng og 25 ng ble identifisert som henholdsvis øvre og nedre grense for DNA-inngang  $\geq 95$  % prøvens første gjennomgangshastighet med ingen uriktige betegnelser (100 % nøyaktighet og betegnelsesfrekvens).

DNA-innganger på 1250 ng, 250 ng og 100 ng ble ytterligere testet med fire representative DNA-prøver og 20 replikater per DNA-inngangsnivå for hver prøve ( $n=4 \times 20=80$  prøver), mens den nedre grensen på 25 ng ble testet med 14 prøver, 20 replikater for hver prøve ( $n=14 \times 20=280$  prøver). Nøyaktigheten og prøvens første gjennomgangshastighet var 100 % på alle DNA-inngangsnivåer og prøvebetegnelsesfrekvenser på  $>99$  %.

## Forstyrrende stoffer

For å vurdere virkningen av forstyrrende substanser på MiSeqDx-plattformen ble en representativ analyse utformet for å undersøke et enkelt gen som dekket 11 529 baser, evaluert i nærvær og fravær av mulige forstyrrende substanser. Åtte fullblodprøver, som representerte åtte unike genotyper, ble brukt i studien. Fire endogene forstyrrende substanser (bilirubin, kolesterol, hemoglobin og triglyserid) ble testet ved å tilsette dem i blodprøver før DNA-ekstraksjonen. For å vurdere forstyrrelsen som resulterte fra blodprøvetaking (kort prøvetaking) ble EDTA tilsatt blodprøvene i to konsentrasjoner. Konsentrasjonsgrensene for hvert stoff vises i tabellen nedenfor. Dessuten, for å vurdere forstyrrelsen fra prøveklargjøringen, ble 15 % vaskebuffer tilsatt åtte rensset genomisk DNA. En 100 % betegnelsesfrekvens ble oppnådd for alle prøvene som ble testet i tillegg til 100 % reproduserbarhet i genotypebetegnelser mellom prøver i nærvær og fravær av forstyrrende substanser.

Testsubstans	Totalt antall replikater	Konsentrasjon testet i blod (øvre grense)	Konsentrasjon testet i blod (nedre grense)	Betegnelsesfrekvens
Bilirubin	16	684 µmol/l	137 µmol/l	100 %
Kolesterol	16	13 mmol/l	2,6 mmol/l	100 %
Hemoglobin	16	2 g/l	0,4 g/l	100 %
Triglyserid	16	37 mmol/l	7,4 mmol/l	100 %
EDTA	16	7 mg/ml	2,8 mg/ml	100 %

## Prøveindeksering

Prøveindeksprimere brukes i settet for å tildele en unik strekkode til hvert prøve-DNA, som gir mulighet til å samle sammen flere prøver i en enkel sekvenseringskjøring.

Totalt 96 prøveindekser ble testet med en representativ analyse, utformet for å undersøke et enkelt gen som dekker 11 529 baser med 8 unike DNA-prøver for å verifisere analysens evne til å utføre kontinuerlig genotypingbetegnelse for en gitt prøve på tvers av ulike kombinasjoner av indekseringsprimeren. Hver prøve ble testet med 12 ulike indekseringsprimerkombinasjoner. Førtiåtte (48) indekskombinasjoner ble testet i én sekvenseringskjøring.

Prøveresultatene ble sammenlignet mot toveis Sanger-sekvenseringsdata for alle posisjoner/varianter. Reproduserbarheten og nøyaktigheten var 100 % for alle prøve-/indeksprimerkombinasjoner.

## Patenter og varemerker

Dette dokumentet og dets innhold er opphavsrettslig beskyttet for Illumina, Inc. og tilknyttede selskaper («Illumina»), og er ment utelukkende for kontraktbruk av kunden i forbindelse med bruk av produktet (produktene) beskrevet her, og for intet annet formål. Dette dokumentet og dets innhold skal ikke brukes eller distribueres til andre formål og/eller på annen måte kommuniseres, fremlegges eller reproduseres på noen måte uten forutgående, skriftlig samtykke fra Illumina. Illumina overfører ikke noen lisens under sitt patent, varemerke, opphavsrett eller sedvanerett eller lignende rettigheter til tredjeparter gjennom dette dokumentet.

Instruksjonene i dette dokumentet skal følges strengt og tydelig av kvalifisert og tilfredsstillende utdannet personell for å sikre riktig og sikker bruk av produktet (produktene) som er beskrevet i dette dokumentet. Alt innhold i dette dokumentet skal leses fullt ut og være forstått før produktet (produktene) brukes.

HVIS DET UNNLATES Å LESE FULLSTENDIG OG UTTRYKkelig FØLGE ALLE INSTRUKSJONENE I DETTE DOKUMENTET, KAN DET FØRE TIL SKADE PÅ PRODUKTET (PRODUKTENE), SKADE PÅ PERSONER, INKLUDERT BRUKERE ELLER ANDRE, OG SKADE PÅ ANNEN EIENDOM.

ILLUMINA PÅTAR SEG IKKE ANSVAR SOM FØLGE AV FEIL BRUK AV PRODUKTET (PRODUKTENE) SOM ER BESKREVET I DETTE DOKUMENTET (INKLUDERT DELER AV DETTE ELLER PROGRAMVARE).

© 2020 Illumina, Inc. Med enerett.

Illumina, MiSeq, MiSeqDx, den gresskaroransje fargen og streamingbase-designen er varemerker som tilhører Illumina, Inc. og/eller tilknyttede selskaper i USA og/eller andre land. Alle andre navn, logoer og andre varemerker tilhører deres respektive eiere.

## Kontaktinformasjon



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California, 92122 USA  
+1 800 809 ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (utenfor Nord-  
Amerika)  
techsupport@illumina.com  
[www.illumina.com](http://www.illumina.com)

CE



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

### Australsk sponsor

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

## Produktmerking

En fullstendig oversikt over symboler som kan vises på produktemballasje og merking, kan lastes ned i PDF-format fra nettsidene. Gå til [support.illumina.com](http://support.illumina.com), velg et produkt, og velg deretter Documents & Literature (Dokumentasjon og litteratur).