

MiSeq™Dx-instrument

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK
KUN FOR EKSPORT

Tiltenkt bruk

MiSeqDx-instrumentet er beregnet for målrettet sekvensering av DNA-biblioteker fra menneskelig genomisk DNA ekstrahert fra perifert fullblod eller formalinfiksert og parafinnstøpt (FFPE) vev, ved bruk med *in vitro*-diagnostiske analyser som utføres på instrumentet. MiSeqDx-instrumentet er ikke beregnet for helgenomisk eller *de novo*-sekvensering. MiSeqDx-instrumentet skal brukes med registrerte og oppførte, klarerte eller godkjente IVD-reagenser og analyseprogramvare.

Prosedyreprinsipper

Illumina MiSeqDx er beregnet for målrettet resekvensering av menneskelig DNA ved bruk av forbruksmateriell fra Illumina for sekvensering og biblioteker klargjort for menneskelig genomisk DNA ekstrahert fra perifert fullblod eller FFPE-vev ved bruk av registrerte og oppførte, eller godkjente IVD-reagenser. Biblioteker klargjøres ved å forsterke mål og tilsette prøveindekser og fange opp sekvenser. Prøvebiblioteker blir innfanget på en strømningscelle og sekvensert på instrumentet ved hjelp av sekvensering ved syntesekjemi (SBS). SBS-kjemi bruker en reversibel terminator-metode for å påvise enkle nukleotidbaser idet de blir inkorporert i voksende DNA-strenger. Programvaren for sanntidsanalyse (Real-Time Analysis – RTA) utfører bildeanalyser og basebetegnelse, og den tildeler en kvalitetsscore til hver base for hver sekvenseringssyklus. Når primæranalysen er ferdig, kan sekundæranalysen utføres på MiSeqDx-instrumentet for å behandle basebetegnelser.

Behandling omfatter vanligvis demultipleksing, FASTQ-filgenerering, innretting, variantbetegnelse og generering av VCF-filer (variantbetegnelsesformat) som inneholder informasjon om varianter funnet ved spesifikke posisjoner i referanseggenomet. MiSeqDx bruker forskjellige moduler for sekundæranalyse avhengig av arbeidsprosessen.

Dobbeltoppstart-konfigurasjon

Dobbeltoppstart-konfigurasjonen omfatter maskinvaren, programvaren og installasjonsprosedyrene for å la MiSeqDx-instrumentet kjøre sekvenseringsanalyser for både *in vitro*-diagnostikk (IVD) og kun til forskningsbruk (RUO). Dobbeltoppstart-konfigurasjonen gjør det mulig for brukeren å bytte mellom diagnostisk modus og forskningsmodus på instrumentet. Radiofrekvensidentifikasjoner (RFID-er) på sekvenseringsforbruksmateriell forhindrer at RUO-sekvenseringsreagenser blir brukt i diagnostiske sekvenseringskjøringer.

Prosedyremessige begrensninger

- Til *in vitro*-diagnostisk bruk.
- Resultatene som presenteres i etiketten, ble oppnådd med representative analysepaneler ved bruk av perifert fullblod eller celledinjer for kimbaneytelse og FFPE-vev eller FFPE-celledinjer for somatisk ytelse med reagensene og programvaremodulene som er beskrevet. Modulene for kimbanevariant og somatisk variant ble utviklet for å evaluere ytelsen med representative analyser. Ytelseskarakteristikker er kun angitt som informasjon. Valideringstesting som presenteres, er bare for å gi et eksempel på de generelle mulighetene til instrumentet og ikke etablere kapasiteten eller egnetheten til instrumentet når det gjelder spesifikke påstander. Alle diagnostiske tester som ble utviklet for bruk på dette instrumentet, krever full validering for alle ytelsesaspekter.
- Dette produktet er begrenset til å levere følgende:
 - Utdata for sekvensering ≥ 5 Gb med avlesningslengde på 2×150 bp
 - Avlesninger som passerer filter ≥ 15 millioner med avlesningslengde på 2×150 bp
 - Baser høyere enn Q30 ≥ 80 % ved avlesningslengde på 2×150 bp
Lik eller større enn 80 % av baser har kvalitetsscore på Phred-skalaen som er høyere enn 30, som indikerer en nøyaktighet av basebetegnelse på større enn 99,9 %.
- MiSeqDx-instrumentet er bare validert til å sekvensere menneskelige DNA-biblioteker som er ekstrahert fra perifert fullblod eller FFPE-vev. Biblioteker som er generert fra andre prøvetyper, skal ikke brukes med dette instrumentet for *in vitro*-diagnostisk bruk. Ytelsen til dette instrumentet når det gjelder sekvensering av mikrobielle eller virale nukleinsyrer fra kliniske prøver, er ikke etablert.
- MiSeqDx er beregnet for *in vitro*-diagnostisk bruk med registrerte og oppførte eller godkjente IVD-reagenser eller analyser. Reagensbegrensninger og ytelseskarakteristikker som er beskrevet i dette pakningsvedlegget, er basert på representative analyser og programvaremoduler. For IVD-analyser kan du se det analysespesifikke pakningsvedlegget for informasjon om tiltenkt bruk, påviste varianter og prøvetype.
- Indelinnhold (insersjoner, delesjoner og kombinasjoner av disse) med en lengde på mer enn 25 bp innrettes ikke av analyseprogrammet. Derfor kan indeler med en lengde på mer enn 25 bp ikke påvises av analyseprogrammet.
- Systemet er validert for påvisning av enkle nukleotidvarianter (SNV) og opptil 25 bp delesjoner og 24 bp insersjoner når det brukes med programvare for kimbane- og somatisk variant-moduler. For somatisk betegnelse ved en variantfrekvens på 0,05 ble 25 bp delesjoner og 18 bp insersjoner påvist.
- PCR-produktavlesninger med ekstremt variantinnhold kan kanskje ikke innrettes av analyseprogramvaren, noe som kan føre til at området rapporteres som villtype. Slikt ekstremt innhold omfatter:
 - Avlesninger som inneholder mer enn tre indeler.

- Avlesninger med lengde på minst 30 bp med SNV-innhold på mer enn 4 % av den totale PCR-produktmållengden (unntatt probeområder).
- Avlesninger med lengde på mindre enn 30 bp med SNV-innhold på mer enn 10 % av den totale PCR-produktlengden (inkludert probeområder).
- Store varianter, deriblant multinukleotidvarianter (MNV-er) og store indeler, kan rapporteres som separate mindre varianter i utdata-VCF-filen.
- Delesjonsvarianter kan filtreres eller utelates når de spenner over to sidestilte PCR-produkter, dersom delesjonslengden er større enn eller lik overlappingen mellom de sidestilte PCR-produktene.
- Systemet kan ikke påvise indeler hvis de oppstår rett ved siden av en primer og det ikke er noe overlappende PCR-produkt. For områder med overlappende PCR-produkter kan ikke analysen påvise delesjoner når overlappingsområdet er mindre enn størrelsen på delesjonen som skal påvises. Hvis for eksempel overlappingsområdet mellom to tilstøtende PCR-produkter er to (2) baser, kan analysen ikke påvise delesjoner som inkluderer begge disse basene. En enkelt basedelesjon på én av disse basene kan påvises.
- Som ved alle hybridiseringsbaserte arbeidsprosesser for bibliotekklargjøring kan underliggende polymorfismer eller mutasjoner, innsetninger eller slettinger i oligonukleotidbindende områder påvirke allelene som sonderes. Dermed påvirkes også betegnelsene gjort under sekvensering. Eksempel:
 - En variant i fase med en variant i primerområdet kan ikke forsterkes, noe som resulterer i en falsk negativ.
 - Varianter i primerområdet kan forhindre forsterkningen av referanseallelen, noe som resulterer i feil homozygot variantbetegnelse.
 - Indelvarianter i primerområdet kan forårsake en falsk positiv betegnelse på slutten av avlesningen ved siden av primeren.
- Indeler kan filtreres på grunn av strengeavvik hvis de forekommer nær enden av en avlesning og blir «soft-clipped» under innretting.
- Små MNV-er er ikke validert.
- Kopinumrervarianter eller strukturvarianter, for eksempel fusjoner eller translokasjoner, er ikke validert.
- Kimbanespesifikke begrensninger:
 - MiSeqDx-systemet som bruker kimbanevariantmodulen er utviklet for å levere kvalitative resultater for kimbanevariantbetegnelser (f.eks. homozygot, heterozygot, villtype).
 - Ved bruk med kimlinjevariantmodulen er den minimale dekningen per PCR-produkt som er nødvendig for nøyaktig variantbetegnelse, 150x. Antall prøver og det totale antallet baser som er målrettet, påvirker dekningen. GC-innhold og annet genomisk innhold kan påvirke dekning.
 - Variasjon i kopinummer kan påvirke om en variant identifiseres som homozygot eller heterozygot.

- Varianter i en viss gjentakende kontekst filtreres ut i VCF-filene. R_{MxN}-gjentakelsesfilteret brukes til å filtrere varianter dersom hele eller deler av variantsekvensen er til stede gjentatte ganger i referanseggenomet ved siden av variantposisjonen. For kimlinjevariantbetegnelse er det nødvendig med minst 9 repetisjoner i referansen for at en variant skal filtreres, og bare gjentakelser med lengde på opptil 5 bp vurderes (R_{5x9}).
- Somatisk spesifikke begrensninger:
 - MiSeqDx-systemet som bruker den somatiske variantmodulen, er utviklet for å levere kvalitative resultater for somatisk variantbetegnelse (dvs. tilstedeværelse av en somatisk variant med en variantfrekvens som er større enn eller lik 0,026 med en deteksjonsgrense på 0,05).
 - Ved bruk med den somatiske variantmodulen er den minimale dekningen per PCR-produkt som er nødvendig for nøyaktig variantbetegnelse, 450x per oligonukleotidsammenslåing. Antall prøver og det totale antallet baser som er målrettet, påvirker dekningen. GC-innhold og annet genomisk innhold kan påvirke dekning.
 - Varianter i en viss gjentakende kontekst filtreres ut i VCF-filene. R_{MxN}-gjentakelsesfilteret brukes til å filtrere varianter dersom hele eller deler av variantsekvensen er til stede gjentatte ganger i referanseggenomet ved siden av variantposisjonen. For somatisk variantbetegnelse er det nødvendig med minst 6 repetisjoner i referansen for at varianten skal filtreres, og bare gjentakelser med lengde på opptil 3 bp vurderes (R_{3x6}).
 - Den somatiske variantmodulen kan ikke skille mellom kimlinjevarianter og somatiske varianter. Modulen er utformet for å påvise varianter over en rekke variantfrekvenser, men variantfrekvens kan ikke brukes til å skille mellom somatiske varianter og kimlinjevarianter.
 - Normalt vev i prøven påvirker påvisningen av varianter. Den rapporterte påvisningsgrensen er basert på en variantfrekvens i forhold til det totale DNA-et som ekstraheres fra både tumor og normalt vev.

Produktkomponenter

Illumina MiSeqDx består av:

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

Følgende programvarekomponenter kreves for drift og dataanalyse på MiSeqDx-instrumentet:

Programvareapplikasjon	Funksjon	Beskrivelse
MiSeq Operating Software (MOS)	Kontrollerer for betjening av instrumentet	MOS-programvaren styrer driften av instrumentet under sekvensering og generer bilder som brukes av Real-Time Analysis-programvaren (RTA). Du finner mer informasjon i <i>Referanseveiledningen for MiSeqDx-instrumentet for MOS v4 (dokumentnr. 200010452)</i> .
Real-Time Analysis (RTA)	Utfører primæranalyse	RTA-programvaren omdanner bildene som genereres av MOS for hver flis per syklus i sekvenseringskjøringen til basebetegnelsesfiler, som er inndata for analysemodulene til Local Run Manager. RTA-programvareapplikasjonen inneholder ikke et brukergrensesnitt.
Local Run Manager	Grensesnitt for modulvalg	Local Run Manager-programvaren er på en instrumentintegret løsning for brukerstyring, utfører sekundæranalyse og overvåker status. Du finner mer informasjon i <i>Referanseveiledning for Local Run Manager v3-programvare for MiSeqDx (dokumentnr. 200003931)</i> .

Oppbevaring og håndtering

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

Nødvendig utstyr og materialer som ikke følger med

Forbruksmateriell for sekvensering

MiSeqDx Reagent Kit v3 (katalognr. 20037124)

MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (katalognr. 20063860)

Forbruksmateriell skaffet av brukeren

Sørg for at følgende forbruksmateriell skaffet av brukeren er tilgjengelig før du starter en kjøring.

Forbruksmateriell	Formål
Spritservietter, 70 % isopropylalkohol eller etanol, 70 %	Rengjøre strømningscelleglasset og -stadiet
Laboratorieklut, lavt loinnhold	Rengjøre strømningscellestadiet
Linsepapir, 4 x 6 tommer	Rengjøre strømningscellen
Tween 20	Vask av instrumentet
Pinsett, firkantet spiss i plast (valgfritt)	Ta strømningscellen ut av forsendeskassen for strømningscellen
Vann, laboratorie kvalitet	Vask av instrumentet

Retningslinjer for vann av laboratorie kvalitet

Det må alltid brukes vann av laboratorie kvalitet eller deionisert vann for å utføre instrumentprosedyrer. Vann fra springen skal aldri brukes.

Bruk kun vann av følgende kvalitet eller tilsvarende:

- Deionisert vann
- Illumina PW1
- 18 Megaohm (M Ω) vann
- Milli-Q-vann
- Super-Q-vann
- Vann av molekylærbiologisk kvalitet

Advarsler og forholdsregler



ADVARSEL

Dette reagenssettet 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 sikkerhetsdatabladene (SDS) på support.illumina.com/sds.html.

- Håndter alle blodprøver som om de er smittefarlige for humant immunsviktvirus (HIV), humant hepatitt B-virus (HBV) og andre blodbårne patogener (universelle forholdsregler).
- Hvis du unnlater å følge prosedyrene som beskrevet, kan det resultere i feil resultater eller betydelig reduksjon i prøve kvaliteten.
- Bruk rutinemessige forholdsregler for laboratoriet. Ikke pipetter med munnen. Ikke spis, drikk eller røyk i utpekte arbeidsområder. Bruk engangshansker og laboratoriefrakker når du håndterer prøver og settreagenser. Vask hendene grundig etter å ha håndtert prøvene og settreagensene.
- Riktig laboratoriepraksis og god laboratoriehygiene er nødvendig for å forhindre at PCR-produkter kontaminerer reagenser, instrumentering og genomiske DNA-prøver. PCR-kontaminasjon kan føre til unøyaktige og upålitelige resultater.
- For å hindre kontaminasjon må du påse at preforsterknings- og postforsterkningsområdene har sitt eget utstyr og materiell (f.eks. dråpetellere, dråpetellerspisser, varmeblokker, vorteksmiksere og sentrifuger).
- Indeks-prøvesammenkobling må være i nøyaktig samsvar med trykt plateoppsett der det er aktuelt. Local Run Manager fyller automatisk ut indeksprimerne som er tilknyttet prøvenavnene, når de er angitt i modulen. Brukeren anbefales å verifisere indeksprimerne som er tilknyttet prøvene, før sekvenseringskjøringen startes. Misforhold mellom prøven og plateoppsettet resulterer i tap av positiv prøveidentifikasjon og feil resultatrapportering.
- Installasjon av brukerlevert antivirusprogramvare anbefales sterkt for å beskytte datamaskinen mot virus. Se brukerhåndboken for instruksjoner om installering.
- Ikke betjen MiSeqDx hvis noen av panelene er fjernet. Bruk av instrumentet hvis ett eller flere paneler er fjernet, utgjør en potensiell risiko for eksponering overfor linjespenning og likestrømspenning.
- Ikke berør strømningscellen i strømningscellekammeret. Varmeenheten i dette kammeret fungerer mellom 22 °C og 95 °C og kan forårsake brannskader.

- Instrumentet veier omtrent 57 kg og kan forårsake alvorlig skade hvis det faller ned eller behandles på feil måte.
- Alvorlige uønskede hendelser knyttet til dette produktet skal umiddelbart rapporteres til Illumina og ansvarlige myndigheter i medlemslandet der brukeren og/eller pasienten befinner seg.

Bruksanvisning

Følgende bruksanvisninger for MiSeqDx-instrumentet krever reagenser som følger med i MiSeqDx Reagent Kit v3.

Opprette kjøring med Local Run Manager

Du finner detaljerte instruksjoner for å opprette en kjøring i *Referanseveiledning for Local Run Manager v3-programvare for MiSeqDx (dokumentnr. 200003931)* og veiledningen for Local Run Manager-modulen for den analysemodulen du bruker.

Klargjøre reagenskassetten

Følgende instruksjoner beskriver hvordan du tiner reagenser ved hjelp av et vannbad med romtemperatur.

1. Ta reagenskassetten ut fra oppbevaring ved -15 °C til -25 °C .
2. Plasser reagenskassetten i et vannbad som inneholder nok deionisert og romtemperert vann til å senke basen på reagenskassetten opptil vannlinjen som er angitt på reagenskassetten. Ikke la vannet overstige maksgrensen for vann.

Figur 1 Maksgrense for vann



3. La reagenskassetten tine i vannbad ved romtemperatur i ca. 60–90 minutter eller til den er helt tint.
4. Ta kassetten ut av vannbadet, og dunk den forsiktig mot benken for å fjerne vann fra basen av kassetten. Tørk av kassettbasen. Kontroller at det ikke har spruttet vann på toppen av reagenskassetten.

Undersøke reagenskassetten

1. Vend reagenskassetten ti ganger for å blande de tinte reagensene, og kontroller deretter at alle posisjoner er tint.
2. Kontroller reagensene i posisjon 1, 2 og 4 for å se at de er fullstendig blandet og uten bunnfall.

MERK Det er svært viktig at reagensene i kassetten er gjennomtint og blandet for å sørge for skikkelig sekvensering.

3. Dunk kassetten forsiktig mot benken for å fjerne luftbobler i reagensene.

MERK MiSeqDx-sugeenhetsrørene går til bunnen av hver brønn for å aspirere reagensene, så det er viktig at brønnene ikke har noen luftbobler.

4. Sett reagenskassetten på is eller sett den til side ved 2 °C til 8 °C (opptil seks timer) til du er klar til å sette opp kjøringen. De beste resultatene oppnås ved å laste inn prøven og konfigurere kjøringen med en gang.

Klargjøre prøver for sekvensering

Hvis du vil ha mer informasjon om hvordan du klargjør prøvebiblioteker for sekvensering, inkludert bibliotekfortynning og -sammenslåing, finner du dette i avsnittet Bruksanvisning i pakningsvedlegget for bibliotekklargjøring.

Fortynning av prøvebiblioteker avhenger av kompleksiteten av oligonukleotidsammenslåinger. Optimalisering av klyngetetthet på MiSeqDx er nødvendig, og optimal klyngetetthet varierer avhengig av bibliotekklargjøringsanalyse.

Laste prøvebiblioteker på kassett

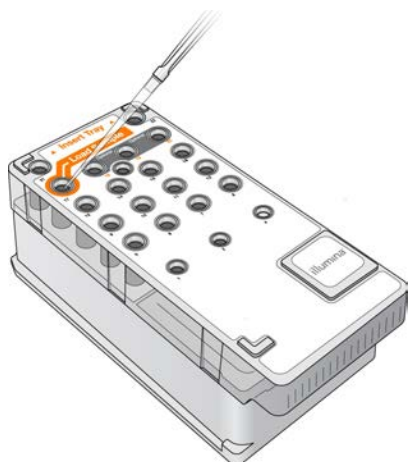
Når reagenskassetten er helt tint og klar til bruk, er du klar til å laste prøver på kassetten.

1. Ved hjelp av en egen, ren og tom 1 ml dråpetellerspiss stikker du hull på folieforseglingen over brønnen i reagenskassetten som er merket **Load Samples** (Last inn prøver).

MERK Ikke stikk hull på noen andre reagensposisjoner. Andre reagensposisjoner blir stukket hull på automatisk under kjøringen.

2. Pipetter 600 µl klargjort fortynnet PCR-produktbibliotek (DAL) for prøvebibliotek i brønnen **Load Samples** (Last inn prøver). Unngå å ta på folieforseglingen.
3. Kontroller om det er luftbobler i brønnen etter at du har lastet inn prøve. Hvis du oppdager luftbobler, dunker du kassetten forsiktig mot benken for å sprekke boblene.

Figur 2 Laste inn biblioteker



4. Gå direkte til kjøringsoppsettrinnene ved hjelp av grensesnittet i MiSeq Operating Software (MOS).

Kjøringsoppsett

Du finner instruksjoner for fullstendig kjøringsoppsett i *Referanseveiledningen for MiSeqDx-instrumentet for MOS v4 (dokumentnr. 200010452)*.

1. Logg på MiSeqDx med passordet for Local Run Manager-programvaren.
2. Velg **Sequence** (Sekvens) i startskjermbildet til MOS-programvaren.
3. Velg en kjøring fra listen, og velg deretter **Next** (Neste).
En serie med skjermbilder for kjøringsoppsett åpner seg i følgende rekkefølge: Load Flow Cell (Last inn strømningscelle), Load Reagents (Last inn reagenser), Review (Gå gjennom) og Pre-Run check (Før kjøring-kontroll).
4. Når skjermbildet Load Flow Cell (Last inn strømningscelle) vises, skal strømningscellen rengjøres og deretter lastes inn.
5. Lukk strømningscellesperren og døren til strømningscellekammeret.
Både sperren og kammerdøren må være lukket før du begynner kjøringen. Når strømningscellen er lastet inn, leser programvaren av og registrerer RFID. En bekreftelse på at RFID ble lest av, vises i nedre høyre hjørne i skjermbildet.
6. Følg meldingene i programvaren for å laste inn flasken med MiSeqDx SBS-oppløsning (PR2), og kontroller at avfallsflasken er tom før du laster inn reagenskassetten.
Når flasken med MiSeqDx SBS-oppløsning (PR2) og reagenskassetten er lastet inn, leser programvaren av og registrerer RFID. En bekreftelse på at RFID ble lest av, vises i nedre høyre hjørne i skjermbildet.
7. Skjermbildet Sequencing (Sekvensering) åpnes når kjøringen starter. Dette skjermbildet gir en visuell fremstilling av kjøringen som pågår, inkludert intensiteter og kvalitetsscorer (Q-scorer).

Resultater

Real-Time Analysis (RTA) er en integrert programvare som utfører bildeanalyse og basebetegnelse, og den tilordner en kvalitetsscore til hver base for hver sekvenseringssyklus. Når en primæranalyse er fullført, starter modulen på MiSeqDx-instrumentet, som er valgt i [Opprette kjøring med Local Run Manager på side 8](#), en sekundæranalyse. Se analysespesifikk dokumentasjon for andre arbeidsprosesser.

Kvalitetskontrollprosedyrer

MiSeqDx-programvaren evaluerer hver kjøring, prøve og basebetegnelse mot kvalitetskontrollmetrikk. Ved behov skal de positive og negative kontrollene som inkluderes i bibliotekklargjøringen, også evalueres for forventede resultater.

Ytelseskarakteristikker

Alle studier ble utført på MiSeqDx.

Kimbanestudier brukte enten MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay eller TruSeq Custom Amplicon Kit Dx-reagenser for klargjøring av bibliotek. De to settene bruker identiske reagenser for bibliotekklargjøring og har bare én arbeidsprosessforskjell: antall sykluser med polymerasekjedereaksjoner (PCR) (henholdsvis 25 og 28). De ekstra PCR-syklusene tillater lavere DNA-innmating med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (50 ng) sammenlignet med MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay (250 ng), som vist i DNA-innmatingstudien ved hjelp av TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Biblioteker som ble klargjort med MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay, ble sekvensert med tilhørende sekvenseringsreagenser i settet. Biblioteker som ble klargjort med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, ble sekvensert med MiSeqDx Reagent Kit v3. De sistnevnte sekvenseringsreagensene har økt utdata sammenlignet med de i MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay.

Testingen omfatter prøvevolumområdene støttet av MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. MiSeqDx kan støtte 1–96 prøver/kjøring, avhengig av analysen. MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro er utformet for å støtte lavere prøvevolumer innenfor dette området for utvalgte analyser.

Somatiske studier brukte TruSeq Custom Amplicon Kit Dx med MiSeqDx Reagent Kit v3.

Arbeidsprosessen for kimbane og somatisk, beskrevet for TruSeq Custom Amplicon Kit Dx for å klargjøre biblioteker for sekvensering, ble etterfulgt av analyse ved bruk av modulene Germline Variant

(Kimbanevariant) eller Somatic Variant (Somatisk variant), med to unntak. Studier som brukte ett gen (kimbaneytelse; MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay) eller to gener (somatisk ytelse) som representative mutasjonspaneler, brukte analysespesifikke arbeidsprosesser og analysemoduler.

MERK Genomisk innhold i PCR-produkt er oppsummert knyttet til den genomiske strengen som blir sekvensert. For PCR-produkter designet mot minusstrengen, er referansegenominnholdet bakoverkomplettering (for eksempel PolyA-områder på PCR-produkter med minusstrenger korresponderer med PolyT-områder på referansegenomet).

Definisjoner av beregninger for ytelseskarakteristikker

- Positivt prosentamsvar (PPA) beregnes som andelen av loki klassifisert som varianter ved hjelp av en referansemetode som er korrekt rapportert av analysen.
 - $(\text{antall variantloki korrekt rapportert av analysen}) / (\text{totalt antall variantloki})$
Variantloki rapportert av analysen som samsvarer med referansemetoden, er sant positive (TP). Variantloki rapportert som referansebetegnelser eller som forskjellige variantbetegnelser av analysen, er falskt negative (FN).
- Negativt prosentamsvar (NPA) beregnes som andelen av loki klassifisert som villtype ved hjelp av en referansemetode som er korrekt rapportert av analysen.
 - $(\text{antall villtypeloki korrekt rapportert av analysen}) / (\text{totalt antall villtypeloki})$
Villtypeloki rapportert av analysen som samsvarer med referansemetoden, er sant negative (TN). Villtypeloki rapportert som varianter av analysen, er falskt positive (FP).
- Samlet prosentamsvar (OPA) beregnes som andelen loki som er korrekt rapportert av analysen i forhold til en referansemetode.
 - $((\text{antall variantloki korrekt rapportert av analysen}) + (\text{antall villtypeloki korrekt rapportert av analysen})) / ((\text{totalt antall variantloki}) + (\text{totalt antall villtypeloki}))$
- Beregningene av PPA, NPA og OPA inkluderer ikke noen betegnelser (variant- eller referansloki som ikke oppfyller ett eller flere kvalitetsfiltre) for bruk i variantbetegnelse. To studier inneholder spesifikt ikke noen betegnelser i målinger av «% korrekte betegnelser», og denne inkluderingen av ingen betegnelser er angitt for de aktuelle tabellene.
- Betegnellesfrekvens er beregnet som det totale antallet lokipasserende filtre som deles på totalt antall posisjoner som er sekvensert for kromosom 1–22. Kromosom X og Y er ekskludert. Denne målingen vurderer ikke samsvaret av betegnelser med referansemetoden.

For ytelseskarakteristikker knyttet til preanalytiske faktorer (f.eks. ekstraksjonsmetoder eller DNA-innmating) kan du se pakningsvedlegget for den aktuelle bibliotekklargjøringsmetoden.

Prøveindeksering

Prøveindeksprimere, lagt til under bibliotekklargjøring, tilordner en unik sekvens til hvert prøve-DNA, som tillater at flere prøver slås sammen til en enkelt sekvenseringskjøring. Prøveindeksering ble testet for arbeidsprosessene kimbane og somatisk.

Totalt 96 prøveindekser ble testet med en representativ analyse designet for et bredt utvalg av gener som dekker 12 588 baser per streng over alle 23 menneskelige kromosomer, for å verifisere analysens evne til å lage en genotypingbetegnelse konsekvent for en gitt prøve på tvers av ulike kombinasjoner av indekseringsprimere. Y-kromosomet inneholder ikke konfidensområder og ble ikke evaluert. Åtte unike prøver ble testet med 12 forskjellige kombinasjoner av indekseringsprimere per prøve. Prøveresultater fra Germline Analysis Module (Kimbaneanalysedmodul) ble sammenlignet med Platinum Genomes versjon 2016-01. PPA (SNV-er og indeler) oversteg 97 % (sanne positive betegnelser var minst 70 for SNV-er, 38 for insersjoner, 36 for delesjoner) og NPA var 100 % (minst 23 440 referanseposisjoner per indeksskombinasjon) for hver av de 96 indeksskombinasjonene. En enkelt indeks ble testet uavhengig for å verifisere at MiSeqDx Reagent Kit v3 sekvenseringskjemi kan støtte mindre enn åtte prøver (forløperkjemien i MiSeqDx Universal Kit 1.0 var begrenset til minimum åtte prøver). Den enkle indeksen hadde PPA-verdier på 98,9 % (180/182) for SNV-er, 100 % (38/38) for insersjoner og 100 % (46/46) for delesjoner. NPA var 100 % (23 856/23 856).

Tolv replikater (24 biblioteker) av en prøve ble testet for å måle indekssnøyaktighet med somatiske varianter ved frekvenser fra 0,05–0,10 ved bruk av Somatic Variant Module (Somatisk variantmodul) (to indeksskombinasjoner per replikat brukes for å lage somatiske betegnelser). PPA var 100 % for SNV-er (64/64), insersjoner (11/11) og delesjoner (19/19). NPA var 100 % (minst 11590 referanseposisjoner per indeksskombinasjon) for alle indeksskombinasjoner.

Carryover av prøver

Arbeidsprosessen til MiSeqDx-instrumentet omfatter bibliotekklargjøring og sekvensering av flere prøver pluss kontroller som alle behandles samtidig. Studien for carryover av prøver ble utført for å evaluere om falskt positive resultater grunnet carryover fra brønn-til-brønn-kontaminasjon ved bibliotekklargjøring eller fra kjøring-til-kjøring-kontaminasjon mellom etterfølgende sekvenseringskjøringer, hadde innvirkning på testresultatene. Somatiske varianter ble brukt fordi de kan påvises ved lavere allelfrekvenshendelser enn kimbanevarianter.

Prøvene besto av fire genomiske DNA-prøver fra cellerlinjer, der hver av dem inneholdt ulike panelmutasjoner i en representativ analyse med et panel med to gener. Prøvene var slik at en mutasjon med en posisjon i det ene panelet, hadde en referansesekvens (villtype) i de andre.

Carryover fra brønn til brønn er definert som en feilmodus som potensielt oppstår under manuelle behandlingstrinn (pipettering, forveksling av prøver, osv.). For å evaluere carryover fra en prøvebrønn til en annen ble det utført to testkjøringer:

- Et sjakkbrettmønstret oppsett av en prøve med høy innmating av genomisk DNA (gDNA) som inneholdt en mutasjon i gen 1, vekslende med en prøve med lav innmating av gDNA som inneholdt en mutant i gen 2.
- Et sjakkbrettmønstret oppsett av en prøve med høy innmating av gDNA som inneholdt en mutasjon i gen 2, vekslende med en prøve med lav innmating av gDNA som inneholdt en mutasjon i gen 1.

I hver kjøring ble totalt 12 replikater evaluert for falskt positive resultater (f.eks. ble en gen 1-mutasjon rapportert i en brønn betegnet som en gen 2-mutantprøve eller omvendt).

Carryover fra kjøring til kjøring defineres som en feilmodus som potensielt er opprettet basert på rester fra en tidligere sekvenseringskjøring. For å avgjøre om det er carryover mellom sekvenseringskjøringene ble to plater som hver inneholdt 11 replikater av en enkelt unik prøve med høy innmating av gDNA pluss en blank prøve, klargjort og sekvensert etter hverandre på et MiSeqDx-instrument og evaluert for falskt positive resultater. Den første kjøringen inneholdt 11 replikater av en gen 2-mutantprøve pluss én blank. Den andre kjøringen inneholdt 11 replikater av en gen 1-mutantprøve pluss 1 blank. Gen 2-mutantprøvebiblioteket ble sekvensert først etterfulgt av en påfølgende sekvenseringskjøring med gen 1-mutantprøvebiblioteket, etterfulgt av en annen gjentatt sekvenseringskjøring av gen 2-mutantprøvebiblioteket. Hvis en gen 2-mutasjon observeres i en kjøring kun med gen 1-mutant eller omvendt, vil denne observasjonen indikere carryover.

Null falske positive (0/24, 0 %) pga. carryover fra *brønn til brønn*, ble rapportert. Alle forventede mutasjoner ble påvist. Null falske positive (0/24, 0 %) pga. carryover fra *kjøring til kjøring*, ble rapportert. Alle forventede mutasjoner ble påvist. Null falske positive (0/48, 0 %) pga. *total carryover* (carryover fra brønn til brønn og kjøring til kjøring), ble rapportert.

Ytelseskarakteristikk for kimbane

Studier som er beskrevet her, brukte Germline Variant Module (kimbanevariantmodul) for å analysere sekvenseringsdata, unntatt de studiene som bruker det ene genpanelet der en analyse-spesifikk modul ble brukt.

Nøyaktighet

Følgende studie ble utført for å vurdere nøyaktigheten til MiSeqDx-instrumentet med MiSeqDx Reagent Kit v3 og DNA av høy kvalitet. Studien brukte en representativ analyse beregnet på å undersøke en rekke gener som dekker 12 588 baser over 23 forskjellige kromosomer ved bruk av 150 PCR-produkter. Y-kromosomet inneholder ikke konfidensområder og ble ikke evaluert. De 12 unike prøvene som ble brukt i denne studien, er fra én enkelt familie – to foreldre og 10 barn – som er sekvensert hyppig i flere laboratorier og med flere sekvenseringsmetoder. Fem av prøvene er fra kvinner og sju er fra menn. Hver av prøvene ble testet i to eksemplarer. Nøyaktighet ble fastslått for SNV-er, insersjoner og delesjoner ved å sammenligne studiedataene med en godt karakterisert referansedatabase. Referansedatabasesekvensen (Platinum Genomes versjon 2016-01) ble utledet fra kombinasjonen av flere sekvenseringsmetoder, offentlig tilgjengelig data og informasjon om arvelighet. Genomiske konfidensområder ble definert basert på denne referansemetoden hvis ikke annet er spesifisert. Totalt ble prøvene kjørt åtte ganger, og tabellene som presenteres for å vise nøyaktighet, er basert på data fra den første kjøringen.

Tabell 1 inneholder studiedataene presentert med positivt og negativt prosentamsvar for hver prøve, der variantresultatene er sammenlignet med en godt karakterisert sammensatt referansemetode for PPA-beregninger. De tre varianttypene (SNV-er, insersjoner og delesjoner) er kombinert. Siden referansemetoden kun gir resultater for de enkle nukleotidvariantene og insersjonene/delesjonene, sammenlignes baseresultater uten variant med referansesekvensen hg19 for humant genom for NPA-beregninger.

Tabell 1 Samsvar av basebetegnelsesresultater per prøve for MiSeqDx-instrumentet

Prøve	Gjennomsnittlig betegnelsesfrekvens	Totalt antall varianter	Totalt antall TP-varianter	Totalt antall FN-varianter	Totalt antall ingen betegnelser	Totalt antall TN-betegnelser	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	152	152	0	4	24024	100	100	100
NA12878	> 99,9	270	266	0	4	23856	100	100	100
NA12879	> 99,9	192	190	1	1	24054	99,5	100	> 99,9

Prøve	Gjennomsnittlig betegnelsesfrekvens	Totalt antall varianter	Totalt antall TP-varianter	Totalt antall FN-varianter	Totalt antall ingen betegnelser	Totalt antall TN-betegnelser	PPA	NPA	OPA
NA12880	> 99,9	222	220	0	6	24052	100	100	100
NA12881	> 99,9	250	247	1	2	23862	99,6	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	200	196	2	2	23962	99,0	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	226	224	0	6	23870	100	100	100
NA12884	> 99,9	228	226	1	1	23942	99,6	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	244	240	2	2	23942	99,2	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	230	228	1	1	23888	99,6	100	> 99,9
NA12888	> 99,9	216	216	0	4	24002	100	100	100
NA12893	> 99,9	236	234	0	2	23810	100	100	100

Den representative analysen besto av 150 PCR-produkter utformet for å dekke diverse genomisk innhold. GC-innholdet i PCR-produktene varierte fra 26 til 87 %. PCR-produkter hadde også et utvalg av enkle nukleotid- (f.eks. PolyA, PolyT), dinukleotid- og trinukleotidrepetisjoner. Data ble samlet på et per PCR-produktgrunnlag ([tabell 2](#)) for å fastslå effekten av genomisk innhold i % korrekte betegnelser. % korrekte betegnelser består av variant- og referansebetegnelser og er mindre enn 100 % hvis det finnes enten ukorrekte eller ingen betegnelser. Ingen betegnelser oppstår når ett eller flere filtre ikke oppfylles for variantbetegnelse (f.eks. utilstrekkelig dekning).

Av de åtte FN-variantene fra [Tabell 2](#), hadde sju en 1 bp insersjon på PCR-produkt 111, som også inneholder PolyA-homopolymer og GC-innhold på 0,29. Den gjenværende 1 FN (feil betegnelse) var på grunn av en uventet heterozygot SNV, på PCR-produkt 125 med et GC-innhold på 0,68, betegnet som en homozygot variant. SNV-variantfrekvensen var 0,71, som er over terskelen på 0,70 for klassifisering som homozygot variant. PCR-produktet med laveste % korrekte betegnelser (98,2 %) var PCR-produkt 17 med 40 ingen betegnelser og inneholdt AT-repetisjoner og GC-innhold på 27 %.

Tabell 2 PCR-produktnivånøyaktighet for MiSeqDx-instrumentet

PCR-produkt	Kromosom	Start for PCR-produkt	Slutt for PCR-produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	Totalt antall korrekte betegnelser	Totalt antall feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	% korrekte betegnelser
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	2232	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	2184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	2208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA (3), indel	0,27	2112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	2160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	I/A	0,65	1944	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	2112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	I/A	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT (3), indel	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	I/A	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT (3), indel	0,49	1680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	2112	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1774	0	2	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1872	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	2328	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	I/A	0,29	1872	0	0	100

PCR-produkt	Kromosom	Start for PCR-produkt	Slutt for PCR-produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	Totalt antall korrekte betegnelser	Totalt antall feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	% korrekte betegnelser
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	1488	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1656	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	I/A	0,78	1800	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT (3), CCA (3)	0,62	2016	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	I/A	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1608	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT (4), AG (3)	0,55	2184	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	10	10	PolyG (6)	0,68	2448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT (5), indel	0,61	2244	0	12	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT (3)	0,55	2352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	2280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	2064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	2256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	2184	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	I/A	0,44	1752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	2112	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	2088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	2160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	2184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	I/A	0,31	1584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	2232	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	I/A	0,42	1992	0	0	100

PCR-produkt	Kromosom	Start for PCR-produkt	Slutt for PCR-produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	Totalt antall korrekte betegnelser	Totalt antall feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	% korrekte betegnelser
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	2113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	2352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	1560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	I/A	0,49	2304	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT (3)	0,37	1992	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1872	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC (3)	0,87	2184	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1896	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	2160	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	2280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC (11), indel	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	I/A	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	I/A	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	I/A	0,45	2304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	I/A	0,65	2400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	1488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	I/A	0,59	2448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	I/A	0,42	2040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	2184	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	2040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	0,34	2040	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA (3)	0,52	2040	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	2016	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	2232	0	0	100

PCR-produkt	Kromosom	Start for PCR-produkt	Slutt for PCR-produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	Totalt antall korrekte betegnelser	Totalt antall feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	% korrekte betegnelser
80	12	30881766	30881846	81	81	I/A	0,49	1944	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	2280	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	I/A	0,52	1752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	2112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	2136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1848	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA (3), TA (3)	0,39	1608	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	I/A	0,25	1992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	2184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	1584	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	2256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	2304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	2232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	2280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	I/A	0,36	2184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	I/A	0,27	1512	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	2280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA (3)	0,41	2088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	2496	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	PolyT (5), indel	0,37	2184	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC (3)	0,64	2136	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	2088	0	0	100

PCR-produkt	Kromosom	Start for PCR-produkt	Slutt for PCR-produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	Totalt antall korrekte betegnelser	Totalt antall feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	% korrekte betegnelser
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	2184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	2232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	2136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1944	7	17	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	2184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT (4), AT (4), indel	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	2064	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG (3)	0,62	2016	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA (3)	0,31	1608	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	I/A	0,37	2184	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	1656	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC (3), indel	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT (3), indel	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	I/A	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	I/A	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	I/A	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	I/A	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	I/A	0,61	2256	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC (3)	0,59	1968	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT (3)	0,58	1824	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT (3), TG (4), indel	0,46	1680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	2424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1608	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	2112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	2088	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	1584	0	0	100

PCR-produkt	Kromosom	Start for PCR-produkt	Slutt for PCR-produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	Totalt antall korrekte betegnelser	Totalt antall feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	% korrekte betegnelser
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	2352	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT (3), indel	0,39	2088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	1656	0	0	100
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	2160	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	2400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	I/A	0,68	2328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	2328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	I/A	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	2208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1656	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	I/A	0,52	1704	0	0	100
148	Ja	2655397	2655461	65	0	I/A	0,55	0	0	0	I/A
149	Ja	2655519	2655609	91	0	I/A	0,48	0	0	0	I/A
150	Ja	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	I/A

Varianter som var ingen betegnelser, er oppsummert i [Tabell 3](#). De bestemte filtrerene som førte til ingen betegnelser, er oppført i tabellen. insersjonen på PCR-produkt 111 ble filtrert for ni av 16 forekomster med de gjenværende sju forekomster betegnet som referanse og er derfor FN-er.

Tabell 3 Oppsummering av varianter av ingen betegnelser

PCR-produktnr.	Krom:Pos	Variant	Korresponderende PCR-produktinnhold	Filter	Utelatte varianter	Forventede varianter	FN-betegnelser
64	10:55892600	TAC > T	AC (11), 42 % GC	R5x9 ¹	10	10	0
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29 % GC	R5x9	9	16	7

¹ R5x9: Gjenta filter. En variant filtreres dersom hele eller deler av varianten er til stede gjentatte ganger i referansegenomet ved siden av variantposisjonen. Minst ni repetisjoner i referansen kreves, og bare repetisjoner med en lengde på opptil 5 bp vurderes.

Sekvenseringsresultatene for prøve NA12878 ble sammenlignet med en svært sikker genotype for NA12878, etablert av National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Av de 150 PCR-produktene var 92 fullstendig innenfor de genomiske konfidensområdene, 41 PCR-produkter hadde delvis overlapping, og 17 PCR-produkter hadde ingen overlapping i NIST-sekvensen. Dette resulterte i 10 000 koordinater per replikat for sammenligning. Basebetegnelse uten variant ble sammenlignet med referansesekvensform 19 for humant genom. Resultatene for nøyaktighet er vist i [Tabell 4](#).

Tabell 4 Samsvar av basebetegnelseresultater for MiSeqDx-instrumentet for NA12878-prøve med NIST-database

Prøve	Antall PCR-produkter	Gjennomsnittlig betegnelserfrekvens	Totalt antall TP-varianter	Totalt antall FN-varianter	Totalt antall TN-betegnelser	Totalt antall FP-betegnelser	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19380	0	100	100	100

Prøvene ble ytterligere analysert for betegnelse av små insersjoner og delesjoner (indeler) ([tabell 5](#)). I noen tilfeller var indelen felles blant to eller flere prøver som gjenspeilt i totalt antall prøvereplikater med Indel-kolonnen. Resultater for begge replikater av de 12 gyldige prøvene er inkludert i [Tabell 5](#). Det var totalt 71 indeler, som varierte i størrelse fra 1–24 bp for insersjoner og 1–25 bp for delesjoner. 69 indeler ble hver påvist med et positivt prosentamsvar på 100 %. Én delesjon (PCR-produkt 64; 2 bp delesjon (chr10 55892600 TAC>T) hadde ingen korrekte betegnelser fordi hver av disse variantene var en ingen betegnelse på grunn av R5x9-filteret. Derfor kunne ikke PPA, som utelukker ingen betegnelser, bli beregnet. En annen indel, 1 bp insersjon (chr17 39589692 C>CA på PCR-produkt 111), hadde heller ingen korrekte betegnelser, fordi ni varianter var en ingen betegnelse på grunn av R5x9-filteret og sju var FN-betegnelser.

Tabell 5 Oppsummering av indelpåvisning med MiSeqDx-instrumentet

PCR-produkt	Kromosom	Posisjon	Analysert fragmentstørrelse	Type og lengde indel for PCR-produkt	Indel	Totalt antall prøvereplikater med indel	Antall ingen betegnelser	Totalt antall feil indelbetegnelser	Totalt antall korrekte indelbetegnelser	PPA
1	1	36450544	93	25 bp delesjon	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	3 bp delesjon	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	23 bp insersjon	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	17 bp delesjon	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	5 bp insersjon	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	3 bp insersjon	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	90	7 bp insersjon	T>TTTGATA	14	0	0	14	100

PCR-produkt	Kromosom	Posisjon	Analysert fragmentstørrelse	Type og lengde indel for PCR-produkt	Indel	Totalt antall prøvereplikater med indel	Antall ingen betegnelser	Totalt antall feil indelbetegnelser	Totalt antall korrekte indelbetegnelser	PPA
9	2	87003972	80	6 bp delesjon	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	87	5 bp insersjon	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	12 bp insersjon	C>CTGAAAATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	2 bp insersjon	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	23 bp delesjon	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	9 bp insersjon	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	1 bp delesjon	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	66	8 bp delesjon	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	11 bp insersjon	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	4 bp delesjon	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	8 bp insersjon	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	21 bp delesjon	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	3 bp delesjon	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32986905	95	25 bp delesjon	CTTTCACCTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	23 bp delesjon	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	1 bp insersjon	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	4 bp delesjon	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	1 bp insersjon	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	4 bp delesjon	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156476548	93	11 bp delesjon	GAATCTGCACTT>G	12	0	0	12	100
52	8	24811064	90	1 bp delesjon	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	4 bp insersjon	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	4 bp insersjon	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	21 bp delesjon	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	3 bp delesjon	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	16 bp delesjon	AGCGTCTATAACCAAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55892600	89	2 bp delesjon	TAC>T	10	10	0	0	I/A
68	11	30177690	70	2 bp insersjon	C>CTG	10	0	0	10	100

PCR-produkt	Kromosom	Posisjon	Analysert fragmentstørrelse	Type og lengde indel for PCR-produkt	Indel	Totalt antall prøvereplikater med indel	Antall ingen betegnelser	Totalt antall feil indelbetegnelser	Totalt antall korrekte indelbetegnelser	PPA
70	11	59837721	62	8 bp insersjon	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100
75	11	118406328	85	8 bp delesjon	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	2 bp delesjon	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	21 bp insersjon	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	19 bp insersjon	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	4 bp insersjon	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	20 bp delesjon	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	22 bp delesjon	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58050081	81	4 bp insersjon	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	16 bp delesjon	CTTGCTCTATAAACCGT>C	10	0	0	10	100
93	14	102808554	94	5 bp delesjon	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	6 bp delesjon	CAAATT>C	12	0	0	12	100
96	15	77879862	95	25 bp delesjon	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	3 bp insersjon	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	4 bp insersjon	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	7 bp delesjon	ATTATTC>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	1 bp delesjon	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	18 bp insersjon	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	4 bp insersjon	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	1 bp insersjon	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	84	24 bp insersjon	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	4 bp delesjon	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	79	12 bp delesjon	TTTGATCTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38837054	75	22 bp insersjon	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	3 bp insersjon	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	85	2 bp delesjon	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	70	15 bp delesjon	TACTTGAGAACTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	101	5 bp insersjon	A>AGTGGG	20	0	0	20	100

PCR-produkt	Kromosom	Posisjon	Analysert fragmentstørrelse	Type og lengde indel for PCR-produkt	Indel	Totalt antall prøvereplikater med indel	Antall ingen betegnelser	Totalt antall feil indelbetegnelser	Totalt antall korrekte indelbetegnelser	PPA
132	20	50897361	67	11 bp insersjon	G>GGAATGTCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	16 bp delesjon	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	11 bp insersjon	G>GATAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	21 bp delesjon	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	5 bp delesjon	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	100	6 bp insersjon	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	5 bp insersjon	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	10 bp delesjon	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

Reproduserbarhet

To studier ble gjennomført for å vurdere reproduserbarheten til MiSeqDx-instrumentet med cellelinjer (studie 1 og 2) eller leukocytutttømt blod tilsatt cellelinjer (studie 2). Studie 1 brukte flere instrumenter. Studie 2 hadde flere steder.

Studie 1

Reproduserbarheten til MiSeqDx-instrumentet ble fastslått ved bruk av to instrumenter, to operatører og to reagensloter i totalt åtte kjøring. Den representative analysen, prøvene og referansemetoden er de samme som beskrevet for nøyaktighetsstudien.

Resultatene er presentert på et per PCR-produkt-grunnlag for hvert instrument ([tabell 6](#)) for å vise reproduserbarheten for betegnelse på tvers av instrumenter. % korrekte betegnelser omfattet både feil og ingen betegnelser (ett eller flere filtre er ikke oppfylt for variantbetegnelse). Instrumentene genererte lignende antall ingen betegnelser og feil betegnelser avhengig av det spesielle PCR-produktet.

Tabell 6 Studieresultater for instrument til instrument-reproduserbarhet for MiSeqDx-instrumentet (PCR-produktnivå)

PCR-produkt	Kromosom	Start for PCR-produkt	Slutt for PCR-produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	7584	0	0	7584	0	0

PCR-produkt	Kromosom	Start for PCR-produkt	Slutt for PCR-produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	8832	0	0	8832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	7776	0	0	7776	0	0
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	6720	0	0	6720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA (3), indel	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	I/A	0,65	7775	1	0	7775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	7200	0	0	7200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	8448	0	0	8448	0	0
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	I/A	0,43	8928	0	0	8928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	AT (3), indel	0,27	8761	0	167	8760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	I/A	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	CT (3), indel	0,49	6720	0	0	6720	0	0
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	8448	0	0	8448	0	0
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	7096	0	8	7096	0	8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	7488	0	0	7488	0	0
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	9312	0	0	9312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	I/A	0,29	7488	0	0	7488	0	0

PCR- produkt	Kromosom	Start for PCR- produkt	Slutt for PCR- produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR- produkt	GC- innhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	5952	0	0	5952	0	0
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	6624	0	0	6624	0	0
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	I/A	0,78	7200	0	0	7200	0	0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT (3), CCA (3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
30	5	41069808	41069871	64	64	I/A	0,39	6144	0	0	6144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	7968	0	0	7968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	6432	0	0	6432	0	0
33	5	149323731	149323821	91	91	CT (4), AG (3)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	7200	0	0	7200	0	0
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	9792	0	0	9792	0	0
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT (5), indel	0,61	8979	0	45	8979	0	45
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT (3)	0,55	9408	0	0	9408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	9120	0	0	9120	0	0
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	8256	0	0	8256	0	0
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	9024	0	0	9024	0	0
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	8736	0	0	8736	0	0
43	7	22202076	22202148	73	73	I/A	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	8448	0	0	8448	0	0
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	8550	0	90	8550	0	90
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	I/A	0,31	6336	0	0	6336	0	0

PCR- produkt	Kromosom	Start for PCR- produkt	Slutt for PCR- produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR- produkt	GC- innhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	I/A	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	8452	0	92	8449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	6432	0	0	6432	0	0
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	9408	0	0	9408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	I/A	0,49	9216	0	0	9216	0	0
57	9	123769149	123769231	83	83	AT (3)	0,37	7968	0	0	7968	0	0
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	7488	0	0	7488	0	0
60	10	11784629	11784726	98	91	GC (3)	0,87	8644	1	91	8644	1	91
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	7584	0	0	7584	0	0
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	8640	0	0	8640	0	0
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	9120	0	0	9120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	AC (11), indel	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	I/A	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	I/A	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	I/A	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	I/A	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	5952	0	0	5952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	I/A	0,59	9792	0	0	9792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	7008	0	0	7008	0	0
73	11	101347052	101347136	85	85	I/A	0,42	8160	0	0	8160	0	0
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	8160	0	0	8160	0	0

PCR- produkt	Kromosom	Start for PCR- produkt	Slutt for PCR- produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR- produkt	GC- innhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	0,34	8160	0	0	8160	0	0
77	11	125769313	125769397	85	85	GA (3)	0,52	8160	0	0	8160	0	0
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	8064	0	0	8064	0	0
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	8928	0	0	8928	0	0
80	12	30881766	30881846	81	81	I/A	0,49	7776	0	0	7776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	6816	0	0	6816	0	0
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	9117	3	0	9119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	I/A	0,52	7008	0	0	7008	0	0
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	7392	0	0	7392	0	0
87	14	31619327	31619393	67	67	GA (3), TA (3)	0,39	6432	0	0	6432	0	0
88	14	39517884	39517966	83	83	I/A	0,25	7968	0	0	7968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	7776	0	0	7776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	8736	0	0	8736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	6336	0	0	6336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	9024	0	0	9024	0	0
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	9216	0	0	9216	0	0
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	8928	0	0	8926	2	0
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	9120	0	0	9120	0	0
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	I/A	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	6720	0	0	6720	0	0

PCR- produkt	Kromosom	Start for PCR- produkt	Slutt for PCR- produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR- produkt	GC- innhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser
101	16	1894910	1894972	63	63	I/A	0,27	6048	0	0	6048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	9120	0	0	9120	0	0
103	16	53682908	53682994	87	87	TA (3)	0,41	8352	0	0	8352	0	0
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	9984	0	0	9984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	PolyT (5), indel	0,37	8736	0	0	8736	0	0
106	17	3563920	3564008	89	89	GC (3)	0,64	8544	0	0	8544	0	0
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	8347	0	5	8347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	8928	0	0	8928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	8544	0	0	8544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT (4), AT (4), indel	0,26	8832	0	0	8832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	7546	0	38	7547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	8256	0	0	8256	0	0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG (3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
117	18	2616456	2616522	67	67	GA (3)	0,31	6432	0	0	6432	0	0
118	18	6980478	6980568	91	91	I/A	0,37	8736	0	0	8736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	6624	0	0	6624	0	0
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC (3), indel	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	CT (3), indel	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	I/A	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	I/A	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	I/A	0,68	7102	2	0	7104	0	0

PCR- produkt	Kromosom	Start for PCR- produkt	Slutt for PCR- produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR- produkt	GC- innhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser
126	19	18186574	18186643	70	70	I/A	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	I/A	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	AC (3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	CT (3)	0,58	7296	0	0	7296	0	0
130	20	21766821	21766890	70	70	GT (3), TG (4), indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	6432	0	0	6432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	8360	0	88	8360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	6336	0	0	6336	0	0
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	9408	0	0	9408	0	0
137	21	36710706	36710792	87	87	GT (3), indel	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	6603	0	21	6601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	8640	0	0	8640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	I/A	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	I/A	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	8832	0	0	8832	0	0
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	6624	0	0	6624	0	0
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	6624	0	0	6624	0	0
147	X	135290777	135290847	71	71	I/A	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Ja	2655397	2655461	65	0	I/A	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Ja	2655519	2655609	91	0	I/A	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Ja	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Resultatene fra reproduserbarhetsstudien ble analysert på et per operatør-grunnlag ved bruk av variantfrekvens (tabell 7). Denne analysen viste at variantfrekvenser var konsekvente på tvers av operatørene. Gjennomsnittlige variantfrekvenser +/- 1 standardavvik er presentert.

Tabell 7 Operatør-til-operatør-resultater for MiSeqDx-instrumentet

Variantfrekvensområde	Antall unike varianter	Totalt antall varianter analysert av operatør 1	Totalt antall varianter analysert av operatør 2	Gjennomsnittlig (SD) rapportert variantfrekvens for operatør 1	Gjennomsnittlig (SD) rapportert variantfrekvens for operatør 2
Homozygot (0,70–1,00)	2424	2424	2422	0,94 +/- 0,07	0,96 +/- 0,05
Heterozygot (0,20–0,70)	8240	8132	8128	0,48 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

Resultater for reproduserbarhetsstudie for hver prøve er vist sammenslått for alle åtte kjøringene (tabell 8). Påvisning evalueres separat for hver varianttype, SNV-er, insersjoner og delesjoner for seg. Referanseposisjoner er utelatt. Denne analysen viste at resultatene for variantene var reproduserbare på tvers av prøvene.

Tabell 8 Samsvar av basebetegnelseresultater per prøve for MiSeqDx-instrumentet

Prøve	SNV-er					Insertjoner				Delesjoner			
	Totalt antall	Totalt antall TP	Totalt antall F	Totalt antall F	Totalt antall F	Totalt antall TP	Totalt antall FP	Totalt antall FN	Totalt antall	Totalt antall TP	Totalt antall FP	Totalt antall FN	
NA12877	592	592	0	0	336	336	0	0	288	288	0	0	
NA12878	1456	1456	0	0	320	304	0	0	384	368	0	0	
NA12879	912	912	0	0	336	320	0	2	288	288	0	0	
NA12880	1072	1071	0	0	384	384	0	0	320	304	0	0	
NA12881	1248	1247	0	1	384	368	0	0	368	368	0	0	
NA12882	944	943	0	1	352	336	0	4	304	288	0	0	
NA12883	1088	1087	0	1	368	368	0	0	352	335	0	0	
NA12884	1088	1088	0	0	400	384	0	5	336	336	0	0	
NA12885	1200	1189	0	7	400	382	0	4	352	336	0	0	
NA12886	1104	1102	0	2	368	352	0	3	368	368	0	0	

Prøve	SNV-er					Inersjoner			Delesjoner			
	Totalt antall	Totalt antall TP	Totalt antall F	Totalt antall F	Totalt antall F	Totalt antall TP	Totalt antall FP	Totalt antall FN	Totalt antall	Totalt antall TP	Totalt antall FP	Totalt antall FN
NA12888	1056	1054	0	2	368	368	0	0	304	304	0	0
NA12893	1168	1168	0	0	352	336	0	1	368	368	0	0

Dataene fra de åtte kjøringene i denne reproduserbarhetsstudien støtter påstanden om at MiSeqDx-instrumentet konsekvent kan sekvensere:

- GC-innhold $\geq 19\%$ (alle betegnede baser i 192 av 192 sekvenserte PCR-produkter med 19 % GC-innhold betegnet korrekt med en ingen betegnelse-frekvens på 1,1 %)
- GC-innhold $\geq 78\%$ (alle betegnede baser i 192 av 192 sekvenserte PCR-produkter med 78 % GC-innhold betegnet korrekt med null ingen betegnelser)
- PolyA-lengder ≤ 8 (PolyA-repetisjon på 8 nukleotider ble betegnet korrekt i 192 av 192 sekvenserte PCR-produkter som inneholdt PolyA = 8)
- PolyT-lengder ≤ 10 (PolyT-repetisjon på 10 nukleotider ble betegnet korrekt i 192 av 192 sekvenserte PCR-produkter som inneholdt PolyT = 10)
- PolyG-lengder ≤ 7 (PolyG-repetisjon på 7 nukleotider ble betegnet korrekt i 192 av 192 sekvenserte PCR-produkter som inneholdt PolyG = 7)
- PolyC-lengder ≤ 6 (PolyC-repetisjon på 6 nukleotider ble betegnet korrekt i 576 av 576 sekvenserte PCR-produkter som inneholdt PolyC = 6)
- Gjentatte lengder for dinukleotid $\leq 11x$ (alle betegnede baser i 192 av 192 sekvenserte PCR-produkter med 11x dinukleotidrepetisjoner ble betegnet korrekt med en ingen betegnelse-frekvens på 0,5 %)
- Gjentatte lengder for trinukleotid $\leq 5x$ (alle betegnede baser i 192 av 192 sekvenserte PCR-produkter med 5x trinukleotidrepetisjoner ble betegnet korrekt med en ingen betegnelse-frekvens på 0,5 %)
- 24 eller færre baseinsersjoner og 25 eller færre basedelesjoner
 - 24 baseinsersjoner betegnet korrekt i 192 av 192 prøver
 - 25 basedelesjoner betegnet korrekt i 223 prøver og feilbetegnet i 1 prøve av 224 prøver

Studie 2

En reproducerbarhetstudie fra sted til sted ble utført med en representativ analyse, Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139 Variant Assay, inkludert et delsett med *CFTR* klinisk signifikante genetiske variasjoner analysert med MiSeq Reporter-programvaren ved bruk av MiSeqDx Platform for målrettet DNA-sekvensering. Den blindede studien brukte 3 teststeder og 2 operatører på hvert sted. To godt karakteriserte paneler med 46 prøver hver ble testet av hver operatør på hvert sted for totalt 810 betegnelser per sted. Panelene inneholdt en blanding av genomisk DNA fra cellelinjer med kjente varianter i *CFTR*-genet, samt leukocyttuttømt blod tilsatt cellelinjer med kjente varianter i *CFTR*-genet. Blodprøvene ble gitt for å tillate inkorporering av ekstraksjonstrinnene som ble brukt for å klargjøre gDNA som fungerer som den primære innmatingen for analysens arbeidsprosess. Prøvens bestått-frekvens, definert som antall prøver som består kvalitetskontrollmetrikk på første forsøk, var 99,88 %. Alle testresultater er basert på innledende testing.

Tabell 9 Oppsummering av resultatene fra reproducerbarhetsstudien utført med en representativ MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

Panel	Prøvenr.	Prøvegenotype	Varianter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarende betegnelser (varianter)			Negative samsvarende betegnelser (villtype)			Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet 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 ¹	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 ¹	100	100	100
A	5 ²	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 ²	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 ³	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ³	0	97,22	99,96	99,92
A	10 ³	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ³	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

Panel	Prøvenr.	Prøvegenotype	Varianter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarende betegnelser (varianter)			Negative samsvarende betegnelser (villtype)			Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C finnes ikke	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
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	I/A	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Prøvenr.	Prøvegenotype	Varianter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarende betegnelser (varianter)			Negative samsvarende betegnelser (villtype)			Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
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	I/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	I/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
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

Panel	Prøvenr.	Prøvegenotype	Varianter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarende betegnelser (varianter)			Negative samsvarende betegnelser (villtype)			Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	I/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	394delTT (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	I/A	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	I/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	I/A	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	I/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	I/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	I/A	100	100

Panel	Prøvenr.	Prøvegenotype	Varianter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarende betegnelser (varianter)			Negative samsvarende betegnelser (villtype)			Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 ⁴	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 ⁴	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 ²	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 ²	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1G>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	I/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 ⁴	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 ⁴	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	I/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

Panel	Prøvenr.	Prøvegenotype	Varianter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarende betegnelser (varianter)			Negative samsvarende betegnelser (villtype)			Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
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
Totalt				74 556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

¹ Villtypeplasseringen som tilsvarer N1303K-varianten for ett replikat, førte til No call (Ingen betegnelse) pga. utilstrekkelig dekning.

² Ett replikat av prøve 5 og 75 hadde en betegnelsesfrekvens på 0 %. Videre undersøkelser indikerer at prøver muligens ikke er blitt tilsatt prøveplaten før bibliotekklargjøring, fordi prøvevolumene som var igjen i rørene, stemte overens med at det ikke var fjernet noe volum.

³ Dokumentasjon viser at prøve 9 og 10 sannsynligvis ble byttet om av operatøren før bibliotekklargjøring.

⁴ Villtypeplasseringen som tilsvarer M1V-varianten for ett replikat av hver av to prøver, førte til en No call (Ingen betegnelse) pga. utilstrekkelig dekning.

Karakteristikker for somatisk ytelse

Studier som er beskrevet her, brukte Somatic Variant Module (Somatisk variantmodul) for å analysere sekvenseringsdata, unntatt de studiene som bruker de to genpanelene der en analysespesifikk modul ble brukt.

Nøyaktighet

Tre studier ble gjennomført for å vurdere nøyaktigheten til MiSeqDx-instrumentet med DNA ekstrahert fra FFPE-prøver.

Studie 1

Studien brukte en representativ analyse beregnet på å undersøke en rekke gener som dekker 12 588 baser over 23 forskjellige kromosomer ved bruk av 150 PCR-produkter. Y-kromosomet inneholder ikke konfidensområder og ble ikke evaluert. De fem unike prøvene som ble brukt i denne studien, er fra én enkelt familie – to foreldre og tre barn – som er hyppig sekvensert i flere laboratorier og med flere sekvenseringsmetoder. Tre prøver er fra kvinner og to er fra menn. Alle prøvene ble formalinfiksert og parafininstøpt før DNA ble ekstrahert for studien. Prøve GM12877 ble fortennet, på DNA-nivå, med prøve GM12878 for å skape GM12877-D for å lage et sett med varianter med frekvenser nær 5 % og 10 %. Hver av prøvene ble testet i to eksemplarer, unntatt GM12877-D som ble testet med fem replikater. Nøyaktighet ble fastslått for SNV-er, insersjoner og delesjoner ved å sammenligne studiedataene med en godt karakterisert referansedatabase. Referansedatabasesekvensen (Platinum Genomes versjon 2016-01) ble utledet fra kombinasjonen av

flere sekvenseringsmetoder, offentlig tilgjengelig data og informasjon om arvelighet. Genomiske konfidensområder ble definert basert på denne referansemetoden hvis ikke annet er spesifisert. Prøvene ble kjørt totalt åtte ganger. Tabellene som presenteres for å vise nøyaktighet, er basert på data fra den første kjøringen.

Tabell 10 inneholder studiedataene presentert med positivt og negativt prosentamsvar for hver prøve, der variantresultatene er sammenlignet med en godt karakterisert sammensatt referansemetode for PPA-beregninger. De tre varianttypene (SNV-er, insersjoner og delesjoner) er kombinert. Siden referansemetoden kun gir resultater for de enkle nukleotidvariantene og insersjonene/delesjonene, sammenlignes baseresultater uten variant med referansesekvensen hg19 for humant genom for NPA-beregninger.

Tabell 10 Samsvar av basebetegnelseresultater med MiSeqDx-instrumentet med referansedata for 6 godt karakteriserte prøver

Prøve	Gjennomsnittlig betegnelsesfrekvens	Totalt antall varianter	Totalt antall TP-varianter	Totalt antall FN-varianter	Totalt antall TN-betegnelser	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	152	147	0	23719	100	100	100
GM12878	98,4	270	260	0	23482	100	100	100
GM12879	98,7	192	186	0	23744	100	100	100
GM12885	99,1	244	236	0	23713	100	100	100
GM12886	98,7	230	226	0	23652	100	100	100
GM12877-D ¹		675	650	0		100	100	100
GM12877-D ²	98,4	155	155	0	57608	100	100	100

¹ Varianter med frekvens høyere enn 20 %.

² Variant med frekvens lavere enn 20 %.

De 150 PCR-produktene ble utformet for å dekke diverse genomisk innhold. GC-innholdet i PCR-produktene varierte fra 26 til 87 %. PCR-produkter hadde også et utvalg av enkle nukleotid- (f.eks. PolyA, PolyT), dinukleotid- og trinukleotidrepetsjoner. 6 unike prøver ble brukt i analysen. Data ble samlet på et per PCR-produktgrunnlag (**tabell 11**) for å fastslå effekten av genomisk innhold i % korrekte betegnelser. % korrekte betegnelser består av variant- og referansebetegnelser og er mindre enn 100 % hvis det finnes enten feil eller ingen betegnelser. Ingen betegnelser oppstår når ett eller flere filtre ikke oppfylles for variantbetegnelse (f.eks. utilstrekkelig dekning). Det var ingen feil betegnelser. Antall ingen betegnelser varierte betydelig over PCR-produktene. GC-innhold og flere interaksjoner med GC-innhold var de mest signifikante prediktorene for ingen betegnelser. 2040/2580 (79 %) av ingen betegnelser kom av at de ikke oppfylte dekningsspesifikasjonen. PCR-produkter med GC-innhold høyere enn 78 % førte til flest ingen betegnelser. Et representativt PCR-produkt med et GC-innhold på 78 %, hadde totalt 675 ingen betegnelser. Et representativt PCR-produkt med et GC-innhold på 87 %, hadde totalt 1365 ingen betegnelser. Dekning kan økes ved å redusere antall prøver som lastes inn i strømningscellen, som kan gi påvisning på PCR-produkter med høyt GC-innhold.

Tabell 11 Nøyaktighetsdata for PCR-produktnivå

PCR-produkt	Kromosom	Start for PCR-produkt	Slutt for PCR-produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	Totalt antall korrekte betegnelser	Totalt antall feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	% korrekte betegnelser
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	1380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1215	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA (3), indel	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	1350	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	I/A	0,65	1215	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1117	0	10	99,1
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	1320	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	1365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	I/A	0,43	1395	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1095	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT (3), indel	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	I/A	0,43	1245	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT (3), indel	0,49	1050	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	1305	0	30	97,8
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1108	0	2	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1170	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	1455	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	I/A	0,29	1169	0	1	99,9

PCR-produkt	Kromosom	Start for PCR-produkt	Slutt for PCR-produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	Totalt antall korrekte betegnelser	Totalt antall feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	% korrekte betegnelser
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	930	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1035	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	920	0	10	98,9
28	5	1882081	1882158	78	75	I/A	0,78	450	0	675	40,0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT (3), CCA (3)	0,62	1260	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	I/A	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1245	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1005	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT (4), AG (3)	0,55	1365	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1125	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	1530	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	1380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT (5), indel	0,61	1383	0	27	98,1
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT (3)	0,55	1455	0	15	99,0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	1425	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	1290	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	1410	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	1365	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	I/A	0,44	1095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	1320	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	1299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	1275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	1350	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	1365	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	I/A	0,31	990	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	1395	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	I/A	0,42	1245	0	0	100

PCR-produkt	Kromosom	Start for PCR-produkt	Slutt for PCR-produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	Totalt antall korrekte betegnelser	Totalt antall feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	% korrekte betegnelser
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	1305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1005	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	1470	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	I/A	0,49	1440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT (3)	0,37	1242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	1455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1170	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC (3)	0,87	0	0	1365	0
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1185	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	1350	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	1425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC (11), indel	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	I/A	0,49	1200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	I/A	0,51	1215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	I/A	0,45	1440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	I/A	0,65	1500	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	930	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	I/A	0,59	1530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	I/A	0,42	1275	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	1365	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	1275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	0,34	1275	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA (3)	0,52	1275	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	1260	0	14	98,9
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	1395	0	0	100

PCR-produkt	Kromosom	Start for PCR-produkt	Slutt for PCR-produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	Totalt antall korrekte betegnelser	Totalt antall feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	% korrekte betegnelser
80	12	30881766	30881846	81	81	I/A	0,49	1215	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1065	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	1425	0	0	100
83	12	24167504	24167576	73	73	I/A	0,52	1095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	1335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1155	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA (3), TA (3)	0,39	1005	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	I/A	0,25	1245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1215	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	1365	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	975	0	60	94,2
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	1410	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	1440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	1395	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	1425	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	I/A	0,36	1365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1050	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	I/A	0,27	945	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	1425	0	0	100
103	16	3682908	53682994	87	87	TA (3)	0,41	1305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	1560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	PolyT (5), indel	0,37	1362	0	3	99,8
106	17	3563920	3564008	89	89	GC (3)	0,64	1335	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	1303	0	2	99,8

PCR-produkt	Kromosom	Start for PCR-produkt	Slutt for PCR-produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	Totalt antall korrekte betegnelser	Totalt antall feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	% korrekte betegnelser
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	1365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	1395	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	1335	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1215	0	78	94,0
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	1365	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT (4), AT (4), indel	0,26	1365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	1289	0	1	99,9
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG (3)	0,62	1260	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA (3)	0,31	1005	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	I/A	0,37	1365	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	1035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC (3), indel	0,47	1215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT (3), indel	0,45	1275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	I/A	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	I/A	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	I/A	0,68	1110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	I/A	0,64	1050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	I/A	0,61	1410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC (3)	0,59	1230	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT (3)	0,58	1140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT (3), TG (4), indel	0,46	1050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	1515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1005	0	6	99,4
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	1320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	1305	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	990	0	0	100

PCR-produkt	Kromosom	Start for PCR-produkt	Slutt for PCR-produkt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	Totalt antall korrekte betegnelser	Totalt antall feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	% korrekte betegnelser
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	1470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT (3), indel	0,39	1305	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	1029	0	7	99,3
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	1350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	I/A	0,68	1455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	1455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	I/A	0,6	1485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	1380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1035	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	I/A	0,52	1065	0	0	100
148	Ja	2655397	2655461	65	0	I/A	0,55	0	0	0	I/A
149	Ja	2655519	2655609	91	0	I/A	0,48	0	0	0	I/A
150	Ja	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	I/A

Varianter som var ingen betegnelser, er oppsummert i [Tabell 12](#). De bestemte filtrere som førte til ingen betegnelser, er oppført i tabellen.

Tabell 12 Oppsummering av varianter av ingen betegnelser

PCR-produktnr.	Krom:Pos	Variant	Korresponderende PCR-produktinnhold	Filter	Utelatte varianter	Forventede varianter
28	5:1882129	T > G	78 % GC	Lav DP ¹	8	13
52	8:24811064	AG > A	PolyG (7), CTC (4), 61 % GC	R3x6 ²	15	15
60	10:11784633	C > T	PolyGC (3), 87 % GC	Lav DP	13	13
64	10:55892600	TAC > T	AC (11), 42 % GC	R3x6	9	9
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29 % GC	R3x6	13	13

¹ Lav DP: Lav dekning. En variant filtreres hvis dybden i minst én av sammenslåingene ved denne bestemte posisjonen er under 900.

² R3x6: Gjenta filter. En variant filtreres dersom hele eller deler av varianten er til stede gjentatte ganger i referansegenomet ved siden av variantposisjonen. Minst seks repetisjoner i referansen kreves og bare repetisjoner med en lengde på opptil 3 bp vurderes.

Sekvenseringsresultatene for prøven ble sammenlignet med en svært sikker genotype for NA12878, etablert av National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Av de 150 PCR-produktene var 92 fullstendig innenfor de genomiske konfidensområdene, 41 PCR-produkter hadde delvis overlapping, og 17 PCR-produkter hadde ingen overlapping i NIST-sekvensen. Dette resulterte i 10 000 koordinater per replikat for sammenligning. Basebetegnelser uten variant ble sammenlignet med referansesekvensform hg19 for humant genom. Resultatene for nøyaktighet er vist i [Tabell 13](#).

Tabell 13 Samsvar av basebetegnelseresultater for MiSeqDx-instrumentet for GM12878-prøve med NIST-database

Prøve	Antall PCR-produkter	Gjennomsnittlig betegnelsesfrekvens	Totalt antall TP-variantbetegnelser	Totalt antall FN-variantbetegnelser	Totalt antall TN-betegnelser	Totalt antall FP-betegnelser	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19231	0	100	100	100

De fem ufortynnede prøvene ble ytterligere analysert for betegnelse av små insersjoner og delesjoner (indeler) ([tabell 14](#)). I noen tilfeller var indelen felles blant to eller flere prøver som gjenspeilt i totalt antall prøvereplikater med Indel-kolonnen. Resultater for begge replikater av de fem prøvene er inkludert i [Tabell 14](#). Det var totalt 71 indeler, som varierte i størrelse fra 1–24 bp for inserjoner og 1–25 bp for delesjoner. 68 indeler ble hver påvist med et positivt prosentamsvar på 1. Tre insersjoner og delesjoner hadde ingen korrekte betegnelser fordi hver av disse variantene var en ingen betegnelse på grunn av R3x6-filteret. Derfor kunne ikke PPA, som utelukker ingen betegnelser, bli beregnet. De tre variantene var 1 bp delesjon (chr8 24811064 AG>A); 2 bp delesjon (chr10 55892600 TAC>T) og 1 bp insersjon (chr17 39589692 C>CA).

Tabell 14 Oppsummering av indelpåvisning med MiSeqDx-instrumentet

PCR-produkt	Kromosom	Posisjon	Analysert fragmentstørrelse	Type og lengde indel for PCR-produkt	Indel	Totalt antall prøvereplikater med indel	Antall ingen betegnelser	Totalt antall feil indelbetegnelser	Totalt antall korrekte indelbetegnelser	PPA
1	1	36450544	93	25 bp delesjon	GAAAATTTAATGAAACACATTGCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	3 bp delesjon	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	23 bp insersjon	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	17 bp delesjon	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	5 bp insersjon	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	3 bp insersjon	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	7 bp insersjon	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	6 bp delesjon	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	5 bp insersjon	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	12 bp insersjon	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100

PCR-produkt	Kromosom	Posisjon	Analysert fragmentstørrelse	Type og lengde indel for PCR-produkt	Indel	Totalt antall prøvereplikater med indel	Antall ingen betegnelser	Totalt antall feil indelbetegnelser	Totalt antall korrekte indelbetegnelser	PPA
16	2	235016388	73	2 bp insersjon	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	23 bp delesjon	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	9 bp insersjon	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	1 bp delesjon	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	8 bp delesjon	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	11 bp insersjon	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	4 bp delesjon	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	8 bp insersjon	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	21 bp delesjon	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	3 bp delesjon	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	25 bp delesjon	CTTTCACTTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	23 bp delesjon	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	1 bp insersjon	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	4 bp delesjon	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	1 bp insersjon	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	4 bp delesjon	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	11 bp delesjon	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	1 bp delesjon	AG>A	15	15	0	0	I/A
53	8	76518677	67	4 bp insersjon	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	4 bp insersjon	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	21 bp delesjon	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	3 bp delesjon	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	16 bp delesjon	AGCGTCTATAACCAAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	2 bp delesjon	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	2 bp insersjon	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	8 bp insersjon	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	8 bp delesjon	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	2 bp delesjon	CTT>C	11	0	0	11	100

PCR-produkt	Kromosom	Posisjon	Analysert fragmentstørrelse	Type og lengde indel for PCR-produkt	Indel	Totalt antall prøvereplikater med indel	Antall ingen betegnelser	Totalt antall feil indelbetegnelser	Totalt antall korrekte indelbetegnelser	PPA
78	12	2834814	84	21 bp insersjon	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	19 bp insersjon	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	4 bp insersjon	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	20 bp delesjon	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	22 bp delesjon	TTTAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	4 bp insersjon	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	16 bp delesjon	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	5 bp delesjon	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	6 bp delesjon	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	25 bp delesjon	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	3 bp insersjon	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	4 bp insersjon	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	7 bp delesjon	ATTATTC>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	1 bp delesjon	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	18 bp insersjon	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	4 bp insersjon	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	84	1 bp insersjon	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	24 bp insersjon	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	4 bp delesjon	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	12 bp delesjon	TTTGTATCTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	22 bp insersjon	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	3 bp insersjon	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	2 bp delesjon	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	15 bp delesjon	TACTTGAGAACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	5 bp insersjon	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	11 bp insersjon	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	16 bp delesjon	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30300873	66	11 bp insersjon	G>GATAAAACTTTA	9	0	0	9	100

PCR-produkt	Kromosom	Posisjon	Analysert fragmentstørrelse	Type og lengde indel for PCR-produkt	Indel	Totalt antall prøvereplikater med indel	Antall ingen betegnelser	Totalt antall feil indelbetegnelser	Totalt antall korrekte indelbetegnelser	PPA
137	21	36710749	87	21 bp delesjon	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	5 bp delesjon	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	6 bp insersjon	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	5 bp insersjon	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	10 bp delesjon	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

Studie 2

Denne studien brukte FFPE-kolorektale kreftvevsprøver fra biobank og en representativ analyse med to gener som ble sammenlignet med referansemotoden, bidireksjonal Sanger-sekvensering (Sanger). Av de totalt 1183 testpersonene hadde 441 gyldig Sanger og representative analyseresultater. Ved evaluering på testpersonnivå (tabell 15), var 230 av de 441 testpersonene positive med Sanger (mutasjon påvist med Sanger). Av disse var 227 positive med den representative analysen. De gjenværende 211 av 441 testpersoner var negative med Sanger (ingen mutasjon påvist med Sanger). Av disse var 206 negative med den representative analysen. Dette resulterte i et positivt prosentsamsvar (PPA) på 98,7 % og et negativt prosentsamsvar (NPA) på 97,6 % (tabell 15).

Tabell 15 Positivt og negativt prosentsamsvar for resultater på testpersonnivå

Representativ analyse	Sanger		Totalt
	Positiv	Negativ	
Positiv	227 ¹	5	232
Negativ	3 ²	206	209
Totalt	230	211	441

Ytelsesoppsummering		
Samsvarsstatistikk	Punktestimat	Nøyaktig 95 % CI
PPA	227/230 = 98,7 %	[96,2 %, 99,7 %]
NPA	206/211 = 97,6 %	[94,6 %, 99,2 %]

¹Det var 224 nøyaktige samsvar for innen testperson, alle mutasjonsnivåresultater. For to testpersoner påviste MiSeqDx den Sanger-påviste mutasjonen og én ekstra mutasjon. For én testperson påviste MiSeqDx og Sanger ulike mutasjoner.

²En testperson hadde to mutasjoner påvist med Sanger. To testpersoner hadde én mutasjon påvist med Sanger.

Studie 3

Denne studien vurderte DNA-biblioteker klargjort med FFPE-prøver på tvers av vevstyper. Totalt 109 FFPE-prøver fra åtte ulike vev (tykktarm, eggstokk, bukspyttkjertel, binyre, blære, lever, skjoldbrusk og bryst) med minst 11 FFPE-prøver som representerte hver vevstype). Binyrevevet omfattet metastase fra spiserør-, lunge- og tykktarmtumorer. Det andre vevet hadde primærtumorer. Denne studien brukte et representativt analysedesign til å undersøke 26 gener som dekket 21 577 baser over 17 ulike kromosomer. Totalt seks ulike gener (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* og *BRAF*) ble Sanger-sekvensert der hver tumor hadde 1–3 gener Sanger-sekvensert basert på forventet forekomst av somatiske mutasjoner for den tumoren. Resultatene fra Sanger-sekvensering identifiserte 39 SNV-somatiske mutasjoner i 33 av 109 FFPE-prøver. MiSeqDx identifiserte 36 SNV-somatiske mutasjoner i 32 av 109 FFPE-prøver med én falsk negativ og to ingen betegnelser for variantposisjon. PPA var 97,3 %. MiSeqDx identifiserte 78 975 referansebaser over de 109 FFPE-prøvene med 29 falske positive knyttet til Sanger-sekvensering og 2437 ingen betegnelser. NPA var 99,9 %. En tobasedelesjon var overensstemmende mellom de to metodene. [Tabell 16](#) sammenfatter resultatene etter vevstype.

Tabell 16 Prosentamsvar for positiv og negativ etter vevstype

Vevstype	Antall prøver	Totalt antall varianter	Totalt antall TP-varianter	Totalt antall FN-varianter	Totalt antall TN-betegnelser	Totalt antall FP-betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	PPA	NPA
Binyre	16	6	4	1	11823	2	607	80	> 99,9
Blære	12	4	4	0	7070	3	273	100	> 99,9
Bryst	16	3	3	0	13439	7	479	100	99,9
Tykktarm	11	6	5	0	8720	2	133	100	> 99,9
Lever	13	3	3	0	7984	1	59	100	> 99,9
Eggstokk	13	7	7	0	10581	1	724	100	> 99,99
Bukspyttkjertel	17	7	7	0	11929	12	489	100	99,9
Skjoldbrusk	11	3	3	0	7429	1	652	100	> 99,9
Totalt	109	39	36	1	78974	29	3416	97,3	> 99,9

Reproduserbarhet

To studier ble gjennomført for å vurdere reproduserbarheten til MiSeqDx-instrumentet med DNA ekstrahert fra FFPE-prøver.

Studie 1 brukte flere instrumenter. Studie 2 hadde flere steder.

Studie 1

Reproduserbarheten til MiSeqDx-instrumentet ble fastslått ved bruk av to instrumenter og to erfarne operatører i totalt åtte kjøring. Den representative analysen, genomisk kontekst for PCR-produkt, prøver og referansemetode er de samme som er beskrevet for nøyaktighetsstudie 1 ovenfor. Resultatene er presentert på et per PCR-produkt-grunnlag for hvert instrument (tabell 17) for å vise reproduserbarheten for betegnelse på tvers av instrumenter. % korrekte betegnelser omfattet både feil og ingen betegnelser (ett eller flere filtre er ikke oppfylt for variantbetegnelse). Instrumentet genererte lignende antall ingen betegnelser avhengig av det spesielle PCR-produktet. En enkelt feil betegnelse med et konfidensområde som definert av Platinum Genomes-referansestandard ble observert for MiSeqDx 1. Den feil betegnelsen var en falskt positiv betegnelse av en insersjonsvariant i PCR-produkt 64 som undersøkte kromosom 10 i posisjon 55892599 til 55892687. PCR-produktet hadde en dinukleotidrepetisjon på 11.

Tabell 17 Studieresultater for instrument til instrument-reproduserbarhet for MiSeqDx-instrumentet (PCR-produktnivå)

PCR-produkt	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser
1	1	93	93	Indel	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Indel	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Indel	0,49	5518	0	2	5518	0	2
5	1	81	81	PolyG (5)	0,69	4858	0	2	4860	0	0
6	1	70	70	PolyT (10) indel	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA (3), indel	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Indel	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Indel	0,38	4800	0	0	4800	0	0
10	2	85	81	I/A	0,65	4859	0	1	4859	0	1
11	2	75	75	PolyA (8)	0,35	4468	0	40	4468	0	40
12	2	88	88	PolyT (5)	0,42	5280	0	0	5280	0	0
13	2	87	87	PolyT (5), indel	0,31	5211	0	43	5214	0	40

PCR-produkt	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser
14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	I/A	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	PolyT (5), indel	0,42	4378	0	2	4379	0	1
17	3	93	93	AT (3), indel	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	I/A	0,43	4980	0	0	4980	0	0
19	3	70	70	CT (3), indel	0,49	4193	0	7	4194	0	6
20	3	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	5220	0	120	5220	0	120
21	3	75	74	Indel	0,57	4432	0	8	4432	0	8
22	4	78	78	PolyA (6)	0,26	4676	0	4	4676	0	4
23	4	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	5820	0	0	5820	0	0
24	4	78	78	I/A	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	PolyA (5), indel	0,36	3720	0	0	3720	0	0
26	4	71	69	PolyA (5)	0,46	4140	0	0	4140	0	0
27	4	62	62	PolyA (7), indel	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	I/A	0,78	3368	0	1132	3485	0	1015
29	5	84	84	GT (3), CCA (3)	0,62	5040	0	0	5040	0	0
30	5	64	64	I/A	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	PolyA (6), indel	0,3	4979	0	1	4980	0	0
32	5	67	67	PolyT (5)	0,37	4020	0	0	4020	0	0
33	5	91	91	CT (4), AG (3)	0,55	5460	0	0	5460	0	0
34	5	75	75	Indel	0,43	4498	0	6	4500	0	1
35	6	102	102	PolyG (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0
36	6	92	92	Indel	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	GCT (5), indel	0,61	5532	0	108	5532	0	108

PCR-produkt	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser
38	6	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT (3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60
39	6	95	95	Indel	0,53	5697	0	3	5698	0	2
40	6	86	86	PolyC (6)	0,7	5159	0	1	5160	0	0
41	6	95	94	PolyG (5), indel	0,61	5638	0	2	5638	0	2
42	6	91	91	PolyA (5)	0,44	5460	0	0	5460	0	0
43	7	73	73	I/A	0,44	4380	0	0	4380	0	0
44	7	88	88	Indel	0,35	5279	0	1	5276	0	4
45	7	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	5184	0	36	5181	0	39
46	7	85	85	Indel	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	PolyG (5), indel	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	5460	0	0	5459	0	1
49	7	81	66	I/A	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	Indel	0,35	5580	0	0	5579	0	1
51	8	83	83	I/A	0,42	4980	0	0	4980	0	0
52	8	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Indel	0,3	4020	0	0	4020	0	0
54	9	98	98	PolyG (6)	0,67	5879	0	1	5880	0	0
55	9	65	65	Indel	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	I/A	0,49	5760	0	0	5760	0	0
57	9	83	83	AT (3)	0,37	4973	0	7	4978	0	2
58	9	97	97	PolyC (6), indel	0,68	5817	0	3	5818	0	2
59	10	79	78	PolyG (5), indel	0,47	4679	0	1	4680	0	0
60	10	98	91	GC (3)	0,87	450	0	5010	632	0	4828
61	10	79	79	PolyT (5)	0,3	4740	0	0	4740	0	0

PCR-produkt	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser
62	10	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	5400	0	0	5400	0	0
63	10	95	95	Indel	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	AC (11), indel	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	I/A	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	I/A	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	I/A	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	Indel	0,46	4199	0	2	4200	0	1
69	11	100	100	I/A	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	Indel	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	I/A	0,59	6120	0	0	6118	0	2
72	11	73	73	PolyA (5)	0,4	4380	0	0	4380	0	0
73	11	85	85	I/A	0,42	5100	0	0	5100	0	0
74	11	91	91	PolyG (6)	0,55	5437	0	23	5441	0	19
75	11	85	85	Indel	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	0,34	5100	0	0	5100	0	0
77	11	85	85	GA (3)	0,52	5100	0	0	5100	0	0
78	12	84	84	PolyC (5), indel	0,52	5040	0	60	5038	0	63
79	12	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	5577	0	3	5573	0	7
80	12	81	81	I/A	0,49	4860	0	0	4860	0	0
81	12	71	71	PolyA (6)	0,35	4260	0	0	4260	0	0
82	2	95	95	PolyG (5)	0,68	5605	0	95	5605	0	95
83	13	73	73	I/A	0,52	4380	0	0	4379	0	1
84	13	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Indel	0,49	5340	0	0	5340	0	0

PCR-produkt	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser
86	13	77	77	Indel	0,39	4620	0	0	4620	0	0
87	14	67	67	GA (3), TA (3)	0,39	4020	0	0	4020	0	0
88	14	83	83	I/A	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	PolyT (5), indel	0,19	4173	0	147	4173	0	147
90	14	81	81	Indel	0,38	4860	0	2	4860	0	0
91	14	91	91	Indel	0,35	5459	0	1	5460	0	0
92	14	66	66	PolyA (5)	0,41	3900	0	240	3900	0	240
93	14	94	94	Indel	0,62	5637	0	3	5637	0	3
94	15	98	96	PolyC (5)	0,45	5760	0	0	5760	0	0
95	15	68	68	Indel	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	PolyG (5), indel	0,68	5475	0	105	5487	0	93
97	15	95	95	PolyT (6)	0,43	5699	0	1	5700	0	0
98	15	72	71	Indel	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	I/A	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Indel	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	I/A	0,27	3780	0	0	780	0	0
102	16	95	95	PolyC (5)	0,67	5700	0	0	5700	0	0
103	16	87	87	TA (3)	0,41	5220	0	0	5220	0	0
104	16	104	104	PolyC (5)	0,67	6238	0	3	6238	0	3
105	16	91	91	PolyT (5), indel	0,37	5443	0	17	5444	0	16
106	17	89	89	GC (3)	0,64	5251	0	89	5339	0	1
107	17	87	87	PolyC (5), indel	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	Indel	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Indel	0,26	5580	0	0	5580	0	0
110	17	91	89	PolyT (5)	0,54	5340	0	0	5340	0	0

PCR-produkt	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser
111	17	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	4860	0	308	4860	0	07
112	17	91	91	PolyA (5)	0,34	5459	0	1	5459	0	1
113	17	92	92	PolyA (7), AT (3), AT (4), AT (4), indel	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	Indel	0,41	4699	0	41	4700	0	40
115	17	86	86	PolyT (7)	0,22	5153	0	7	5156	0	4
116	17	84	84	GAG (3)	0,62	5039	0	1	5039	0	1
117	18	67	67	GA (3)	0,31	4020	0	0	4020	0	0
118	18	91	91	I/A	0,37	5460	0	0	5460	0	0
119	18	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9
120	18	75	75	PolyA (5), indel	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	CTC (3), indel	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	CT (3), indel	0,45	5098	0	2	5098	0	2
123	18	65	65	I/A	0,48	3900	0	0	3900	0	0
124	19	99	99	I/A	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	I/A	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	I/A	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	I/A	0,61	5640	0	1	5638	0	3
128	20	82	82	AC (3)	0,59	4920	0	0	4920	0	0
129	20	76	76	CT (3)	0,58	4559	0	1	4558	0	2
130	20	70	70	GT (3), TG (4), indel	0,46	4200	0	0	4200	0	0
131	20	101	101	Indel	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	Indel	0,36	4020	0	31	4020	0	25
133	20	91	88	PolyG (6)	0,73	5277	0	3	5274	0	6
134	20	87	87	Indel	0,57	5218	0	2	5218	0	2

PCR-produkt	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensområder	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	Totalt korrekte betegnelser	Totalt feil betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser
135	21	66	66	Indel	0,35	3959	0	1	3957	0	3
136	21	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	5880	0	0	5880	0	0
137	21	87	87	GT (3), indel	0,39	5220	0	0	5220	0	0
138	21	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	4119	0	31	4113	0	37
139	21	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	5399	0	1	5399	0	1
140	22	100	100	Indel	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	I/A	0,68	5819	0	1	5819	0	1
142	22	97	97	Indel	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	I/A	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	Indel	0,66	5519	0	1	5519	0	1
145	X	69	69	PolyT (5)	0,26	4139	0	1	4140	0	0
146	X	69	69	PolyC (5)	0,62	4136	0	4	4137	0	3
147	X	71	71	I/A	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	Ja	65	0	I/A	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Ja	91	0	I/A	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Ja	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Resultatene fra reproducerbarhetstudien ble analysert på et per operatør-grunnlag ved bruk av variantfrekvens ([tabell 18](#)). Denne analysen viste at variantfrekvenser var konsekvente på tvers av operatørene. Gjennomsnittlige variantfrekvenser +/- 1 standardavvik er presentert.

Tabell 18 Operatør-til-operatør-resultater for MiSeqDx-instrumentet

Variantfrekvensområde	Antall unike varianter	Totalt antall varianter analysert av operatør 1	Totalt antall varianter analysert av operatør 2	Gjennomsnittlig (SD) rapportert variantfrekvens for operatør 1	Gjennomsnittlig (SD) rapportert variantfrekvens for operatør 2
Høy frekvens (~100 %)	1112	1072	1072	0,96 +/- 0,05	0,96 +/- 0,05
Middels frekvens (~50 %)	3240	3151	3161	0,49 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04
Lav frekvens (3–7 %)	620	618	612	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01

Resultater for reproduserbarhetsstudie for hver prøve er vist sammenslått for alle åtte kjøringene ([tabell 19](#)). Påvisning evalueres separat for hver varianttype — SNV-er, insersjoner og delesjoner for seg. Posisjoner det er henvisning til, er utelatt. Denne analysen viste at resultatene for variantene var reproduserbare på tvers av prøvene.

Tabell 19 Samsvar av basebetegnelsesresultater per prøve for MiSeqDx-instrumentet

Prøve	SNV-er			Insertjoner					Delesjoner			
	Totalt antall	Totalt antall TP	Totalt antall FP	Totalt antall FN	Totalt antall	Totalt antall TP	Totalt antall FP	Totalt antall FN	Totalt antall	Totalt antall TP	Totalt antall FP	Totalt antall FN
GM12877	592	574	2	0	336	336	0	0	228	272	0	0
GM12878	1456	1432	0	0	320	304	0	0	384	352	0	0
GM12879	912	896	0	0	336	320	0	0	288	272	0	0
GM12885	1200	1192	0	0	400	384	0	0	352	320	0	0
GM12886	1104	1104	0	0	368	352	0	0	368	352	0	0
GM12877-D1 ¹	3640	3582	0	0	800	760	0	0	960	880	0	0
GM12877-D2 ²	400	398	0	0	520	516	0	0	560	556	0	0

¹ Varianter med frekvens høyere enn 20 %.

² Variant med frekvens lavere enn 20 %.

Dataene fra de 8 kjøringene i denne reproducerbarhetsstudien støtter påstanden om at MiSeqDx-instrumentet konsekvent kan sekvensere:

- GC-innhold $\geq 19\%$ (alle betegnede baser i 120 av 120 sekvenserte PCR-produkter med 19 % GC-innhold betegnet korrekt med en ingen betegnelse-frekvens på 3,4 %)
- GC-innhold $\geq 73\%$ (alle betegnede baser i 120 av 120 sekvenserte PCR-produkter med 73 % GC-innhold betegnet korrekt med en ingen betegnelse-frekvens på 0,1 %)
- PolyA-lengder ≤ 8 (PolyA-repetisjon på 8 nukleotider ble betegnet korrekt i 120 av 120 sekvenserte PCR-produkter som inneholdt PolyA = 8)
- PolyT-lengder ≤ 10 (PolyT-repetisjon på 10 nukleotider ble betegnet korrekt i 120 av 120 sekvenserte PCR-produkter som inneholdt PolyT = 10)

- PolyG-lengder ≤ 6 (PolyG-repetisjon på 6 nukleotider ble betegnet korrekt i 720 av 720 sekvenserte PCR-produkter som inneholdt PolyG = 6)
- PolyC-lengder ≤ 6 (PolyC-repetisjon på 6 nukleotider ble betegnet korrekt i 359 av 360 sekvenserte PCR-produkter som inneholdt PolyC = 6, med 1 ingen betegnelse)
- Gjentatte lengder for dinukleotid $\leq 4x$ (alle betegnede baser i 600 av 600 sekvenserte PCR-produkter med 4x dinukelotidrepetisjoner ble betegnet korrekt med en ingen betegnelse-frekvens på 0,4 %)
- Gjentatte lengder for trinukleotid $\leq 5x$ (alle betegnede baser i 120 av 120 sekvenserte PCR-produkter med 5x trinukelotidrepetisjoner ble betegnet korrekt med en ingen betegnelse-frekvens på 1,9 %)
- 24 eller færre baseinsersjoner og 25 eller færre basedelesjoner
 - 24 baseinsersjoner betegnet korrekt i 120 av 120 prøver
 - 25 basedelesjoner betegnet korrekt i 182 prøver og rapportert som ingen betegnelse i 2 av 184 prøver

Studie 2

En ekstern studie ble utført for å vurdere reproduserbarheten til de representative to genanalysene, beskrevet i nøyaktighet for studie 2, over tre eksterne teststeder (to operatører per sted), én reagenslot og tre ikke-påfølgende testdager. Testing ble utført med seks godt karakteriserte prøvepaneler med genomiske DNA-prøver fra kliniske FFPE-prøver eller cellelinjer. Hvert panel besto av 10 medlemmer, med totalt 60 medlemmer på tvers av panelene.

De 60 panelmedlemmene besto av duplikater av fire unike villtypeprøver (for panelmutasjoner), 12 unike mutantprøver (med en enkelt mutasjon) klargjort ved både høye og lave mutasjonsfrekvensnivåer, og to unike mutantprøver (med en enkelt mutasjon) klargjort ved kun et lavt mutasjonsfrekvensnivå. Hver unike prøve/mutasjonsfrekvensnivåprøve (testet i to eksemplarer i hver kjøring) hadde 36 mulige resultater (2 replikater \times 2 operatører \times 3 dager \times 3 steder) hvis alle resultater var gyldige.

Prosentandel forventet betegnelse (PEC) over alle positive og negative varianter ble evaluert ved å sammenligne det representative analyseresultatet med forventet mutasjonresultat (forventet mutasjon påvist eller ikke påvist) i hver prøve. PEC beregnes som 100 % ganget med antall forventede betegnelser delt på antall betegnelser forsøkt. Det tosidige 95 % konfidensintervallet beregnes ved å bruke Wilson-scoremetoden.

Ved å kombinere steder var prøvegjennomgangshastighet $\geq 94,7$ % for første kjøring av prøven eller i prøver testet i kjøring som var gyldige i første gjennomgang. Mutasjonsnivå-PEC over alle mutantprøver var 99,6 % (905/909) (95 % CI; 98,9, 99,8). Antall forsøkte betegnelser over alle 56 panelmutasjoner (uansett om en påvist mutasjon var forventet eller ikke) for alle gyldige prøver var 58 856

(56 × 1051). Av disse 58 856 mutasjonsnivåobservasjonene var det bare seks tilfeller der det observerte og forventede resultatet var uoverensstemmende. Mutasjonsnivå-PEC over alle positive og negative varianter fra alle mutant- og villtypepanelmedlemmer kombinert, var 99,99 % (58 850/58 856).

Analytisk sensitivitet (blindgrense (LoB) og deteksjonsgrense (LoD))

Denne studien verifiserte analysecuttoff og påviste deteksjonsgrensen (LoD) for MiSeqDx med et representativt panel. Kort sagt var de godt karakteriserte Platinum Genome-cellelinjene GM12878 og GM12877 formalinfiksert og parafininstøpt, og deretter ble DNA ekstrahert. GM12878 ble fortynnet med GM12877 slik at variantfrekvensene for sytti varianter (52 SNV-er, ni insersjoner og ni delesjoner) var nær 0,05. De to DNA-prøvene ble testet av to operatører, ved bruk av to instrumenter og to reagensloter, med totalt 10 MiSeqDx-sekvenseringskjøringer. Dette førte til 40 replikater for hver variant i GM12878 og 60 replikater for hvert tilsvarende villtypekoordinat i GM12877 for hver reagenslot. LoB og LoD ble beregnet ved hjelp av den klassiske tilnærmingen angitt i CLSI EP17-A2 ved bruk av det parameterfrie alternativet. LoB og LoD ble beregnet for SNV-er, insersjoner og delesjoner separat ved å slå sammen variantfrekvensene for en gitt varianttype. Type I-feilen ble definert som 0,01, og type II-feilen ble definert som 0,05.

For LoB ble de sammenslåtte variantfrekvensene sortert fra lavest til høyest, og 99. plass for hver reagenslot for hver varianttype ble beregnet (tabell 20). MiSeqDx-programvaren bruker cutoff (effektiv LoB) på 0,026 variantfrekvens for å fastslå den kvalitative påvisningen av varianter. De beregnede blindgrensene verifiserte at dette cutoffet førte til en type I-feil på høyst 0,01.

Tabell 20 Blindgrense

Varianttype	Totalt antall variantfrekvenser	LoB for reagenslot 1 (%)	LoB for reagenslot 2 (%)
SNV	3120	0,87	0,75
Insertsjon	540	0,79	0,60
Delesjon	540	0,96	0,84

For LoD ble det beregnet prosentandel for individuell mutasjonsfrekvens for hver reagenslot for hver varianttype som falt under cutoff på 0,026 (tabell 21). Fordi prosentandelene var mindre enn type II-feilen på 5 % (0,05), ble medianen for de kombinerte variantfrekvensene beregnet som LoD (tabell 22). LoD for hver varianttype ble tatt som den største av de to verdiene beregnet for de to reagenslotene – 5,45 % for SNV-er, 4,88 % for insersjoner og 5,44 % for delesjoner.

Tabell 21 Deteksjonsgrense

Reagenslot	Varianttype	Total antall variantfrekvenser	Antall VF-målinger < 2,6 %	% av VF-målinger < 2,6 %	Deteksjonsgrense (%)
1	SNV	2080	5	0,20	5,45
	Inersjon	360	0	0,00	4,86
	Delesjon	360	3	0,80	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Inersjon	360	0	0,00	4,88
	Delesjon	360	0	0,00	5,24

Følgende studier viste ytelseskarakteristikk for MiSeqDx med en annen representativ analyse rettet mot 56 mutasjoner i to klinisk relevante kreftgener (mutasjonspanel). Mutasjonspanelet er utformet til å spesifikt påvise 56 mutasjoner i to klinisk relevante kreftgener (gen 1 og gen 2). Analysen fastslår samtidig tilstedeværelse eller fravær av hver av de 56 mutasjonene i hver sekvenserte prøve. Referansemotoden for disse studiene var bidireksjonal Sanger-sekvensering.

Lot-til-lot-presisjon

En lot-til-lot-presisjonsstudie ble utført for evaluere ytelsen til MiSeqDx-instrumentet på tvers av produserte reagenssettloter (bestående av prøvekalibrering, bibliotekklargjøring og sekvenseringsreagenser) ved bruk av de to genrepresentative analysene ved bruk av et panel med fem blandede FFPE-prøver som oppfyller prøvekalibreringskrav. Hver FFPE-prøve inneholdt to unike mutasjoner: én på et lavere (ca. 8 %) mutasjonsfrekvensnivå og én på et høyt (ca. 14 %) mutasjonsfrekvensnivå. Tolv (12) observasjoner for hver av de fem prøveblandinger ble innsamlet over tre ikke-påfølgende dager med tre reagenssettloter. Det totale antallet observasjoner for studien på tvers av alle reagensloter var 180 observasjoner på tvers av alle prøveblandinger og 360 observasjoner på tvers av alle mutasjonsfrekvensnivåer. På tvers av alle loter og dager viste 99,7 % (359/360) av observasjonene forventet mutasjonsresultat. Én lav frekvensmutasjon ble feilaktig betegnet som en villtype. En varianskomponentanalyse ble utført for hver av mutasjonene/mutasjonsfrekvensnivåene for å beregne variabiliteten til systemet. Det totale standardavviket gikk fra 0,011 til 0,029. Reagenslotkomponenten for det totale standardavviket gikk fra 0 til 0,015.

Revisjonshistorikk

Dokumentnr.	Dato	Beskrivelse av endring
Dokumentnr. 200006218 v01	Mai 2022	Lagt til pakningsvedlegg for MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro CN under delen om utstyr og materialer som leveres, men som ikke er påkrevd. Lagt til testinformasjon for MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro under delen om ytelsesegenskaper. Fjernet forsiktighetsmerknad som er spesifikk for USA, under delen om advarsler og forsiktighetsregler.
Dokumentnr. 200006218 v00	November 2021	Første utgave som støtter MOS v4.0 og Local Run Manager v3.0.

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, OG DETTE VIL UGYLDIGGJØRE EVENTUELL GARANTI SOM GJELDER FOR PRODUKTET (PRODUKTENE).

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).

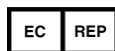
© 2022 Illumina, Inc. Med enerett.

Alle varemerker tilhører Illumina, Inc. eller deres respektive eiere. Ytterligere informasjon om varemerker finner du på www.illumina.com/company/legal.html.

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



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

Produktmerking

Du finner en fullstendig liste over og forklaring på symboler som kan stå på produktemballasjen og i dokumentasjonen for settet du har, på support.illumina.com.