

Indlægsseddel til instrumenter med MOS v4

TIL IN VITRO DIAGNOSTISK BRUG. KUN TIL EKSPORT.

Tilsigtet brug

MiSeqDx-instrumentet er beregnet til targeteret sekventering af DNA-biblioteker fra humant genomisk DNA, der er ekstraheret fra perifert fuldblod eller formalinfikseret, paraffinindstøbt (FFPE) væv ved brug i forbindelse med udførelse af *in vitro*-diagnostiske (IVD) analyser på instrumentet. MiSeqDx-instrumentet er ikke beregnet til helgenom- eller *de novo*-sekventering. MiSeqDx-instrumentet skal anvendes med registrerede og listede, accepterede eller godkendte IVD-reagenser og analysesoftwareprogrammer.

Procedureprincipper

Illumina MiSeqDx er beregnet til targeteret resekventering af humant DNA ved brug af Illumina-sekventeringsmaterialer og biblioteker, der er klargjort ved brug af humant genomisk DNA, der er ekstraheret fra perifert fuldblod eller FFPE -væv, og registrerede og listede, accepterede eller godkendte IVD-reagenser. Bibliotekerne klargøres ved at amplificere målene og tilføje prøveindekserne og optage sekvenserne. Prøvebibliotekerne optages på en flowcelle og sekventeres på instrumentet ved brug af SBS-kemi (Sequencing By Synthesis). SBS-kemien anvender en reversibel terminator-metode til at påvise enkelt nukleotidbaser, når de inkorporeres i voksende DNA-streng. Real-Time Analysis (RTA)-softwaren udfører billedanalyse og basebestemmelse og tildeler en kvalitetsscore til hver base for hver sekventeringscyklus. Når den primære analyse er færdig, udføres den sekundære analyse på MiSeqDx-instrumentet, hvor basebestemmelserne bliver behandlet.

Behandlingen inkluderer typisk demultipleksring, generering af FASTQ-filer, justering, variationsbestemmelse og generering af VCF-filer (Variant Call Format), der indeholder oplysninger om variationer, der er fundet på specifikke positioner i et referencegenom. MiSeqDx anvender forskellige sekundære analysemoduler afhængigt af arbejdsgangen.

Dual boot-konfiguration

Dual boot-konfigurationen omfatter hardwaren, softwaren og installationsprocedurerne og gør det muligt at MiSeqDx-instrumentet kører både *in vitro*-diagnostiske (IVD) sekventeringsanalyser og sekventeringsanalyser til forskningsbrug (RUO). Dual boot-konfigurationen gør det muligt for brugeren at skifte mellem instrumentets diagnostiske tilstand og forskningstilstand. Radiofrekvens-identifikationen (RFID-mærkerne) på sekventeringsmaterialerne forhindrer brug af RUO-sekventeringsreagenser i forbindelse med diagnostiske sekventeringskørsler.

Procedurens begrænsninger

- Til *in vitro*-diagnostisk brug.
- De resultater, der er angivet i mærkningen, er indhentet med repræsentative analysepaneler ved hjælp af perifert fuldblod eller cellelinjer for kimcelleydelse og FFPE-væv eller FFPE-cellelinjer for somatisk ydelse med de beskrevne reagenser og softwaremoduler. Modulerne Germline Variant og Somatic Variant er udviklet med henblik på evaluering af ydelsen med repræsentative analyser. Karakteristika for ydeevne er udelukkende til information. Validationstestningen er kun angivet som eksempel på instrumentets generelle egenskaber og fastlægger ikke instrumentets egenskaber eller velegnethed med hensyn til specifikke krav. Alle diagnostiske tests, der bliver udviklet til brug på dette instrument, skal valideres fuldt ud med hensyn til alle ydelsesaspekter.
- Dette produkt er begrænset til at levere følgende:
 - Sekventeringsoutput ≥ 5 Gb ved en læsningslængde på 2 x 150 bp
 - Læsninger, der passerer filter, ≥ 15 millioner ved en læsningslængde på 2 x 150 bp
 - Baser på mere end Q30 ≥ 80 % og læsningslængde på 2 x 150 bp
Mindst 80 % af basebestemmelserne har kvalitetsscorer på over 30 på Phred-skalaen, hvilket viser, at nøjagtigheden for basebestemmelse er over 99,9 %.
- MiSeqDx-instrumentet er kun valideret til sekventering af humane DNA-biblioteker, der er ekstraheret fra perifert fuldblod eller FFPE-væv. Biblioteker, der er genereret ved hjælp af andre prøvetyper, må ikke anvendes til *in vitro*-diagnostik på dette instrument. Instrumentets ydelse med hensyn til sekventering af mikrobielle eller virale nukleinsyrer fra kliniske prøver er ikke klarlagt.
- MiSeqDx er beregnet til *in vitro*-diagnostisk brug med registrerede og listede, accepterede eller godkendte IVD-reagenser eller -analyser. De reagensbegrænsninger og ydelsesegenskaber, der er beskrevet i denne indlægsseddel, er baseret på repræsentative analyser og softwaremoduler. Med hensyn til IVD -analyser henvises der til den analyse-specifikke indlægsseddel vedrørende tilsigtet brug, detekterede variationer og prøvetype.
- Indels (indsættelser, sletninger eller kombinationer deraf) med en indholdslængde over 25 bp bliver ikke alignet af analysesoftware. Som følge heraf kan analysesoftware ikke påvise indels med en længde over 25 bp.
- Systemet er blevet valideret til at detektere enkelt nukleotidvariationer (SNV'er) og sletning af op til 25 bp og indsættelse af op til 24 bp, når de anvendes sammen med modulsoftwaren Germline og Somatic Variant. Til bestemmelse af somatiske variationer med en variationsfrekvens på 0,05 blev der registreret sletning af 25 bp og indsættelse af 18 bp.
- Amplikonlæsninger med ekstremt variationsindhold vil ikke nødvendigvis blive alignet af analysesoftware, hvilket resulterer i, at området bliver rapporteret som vildtype. Sådant ekstremt indhold omfatter:
 - Læsninger, der indeholder mere end tre indels.
 - Læsninger med en længde på mindst 30 bp med et SNV-indhold på over 4 % af den samlede amplikonmållængde (eksklusive probeområder).

- Læsninger med en længde på under 30 bp med et SNV-indhold på over 10 % af den samlede amplikonlængde (inklusive probeområder).
- Store variationer, inklusive multinukleotid-variationer (MNV'er) og store indels, kan blive rapporteret som separate mindre variationer i VCF-outputfilen.
- Sletningsvariationer kan blive frasorteret eller overset, hvis de spænder over to sideliggende amplikoner, og sletningslængden er over eller lig med overlappningen mellem de to amplikoner.
- Systemet kan ikke påvise indels, hvis de støder direkte op til en primer, og der ikke er noget overlappende amplikon. For områder med overlappende amplikoner kan analysen ikke påvise sletninger, hvis området med overlappning er mindre end størrelsen på den pågældende sletning. Eksempel: Hvis området med overlappning mellem to sideliggende amplikoner er to (2) baser, kan analysen ikke påvise sletninger, inklusive begge disse baser. En enkelt basesletning på en af disse baser kan påvises.
- Ligesom det gælder for enhver anden hybridiseringsbaseret arbejdsgang til biblioteksklargøring, kan underliggende polymorfismer, mutationer, indsættelser eller sletninger i oligonukleotidbindende områder påvirke de alleler, der undersøges. Dermed påvirkes de bestemmelser, der frembringes under sekventeringen, også. Eksempel:
 - En variation i fase med en variation i primer-området vil eventuelt ikke blive amplificeret, hvilket resulterer i en falsk negativ.
 - Variationer i primer-området kan forhindre amplificering af referenceallelen og en deraf følgende ukorrekt bestemmelse af homozygot-variation.
 - Indel-variationer i primerområdet kan forårsage et falsk positivt resultat ved enden af læsningen, der støder op til primeren.
- Indels kan blive frasorteret på grund af streng-bias, hvis de forekommer nær enden af en læsning og er blevet blødt afklippet i forbindelse med alignment.
- Små MNV'er er ikke blevet valideret.
- Kopiantalvariationer og strukturelle variationer, såsom fusioner og translokationer, er ikke blevet valideret.
- Kimcellespecifikke begrænsninger:
 - MiSeqDx-systemet er designet til at levere kvalitative resultater i forbindelse med bestemmelse af kimcellevariationer (f.eks. homozygot, heterozygot, vildtype) ved hjælp af Germline Variant Module.
 - Brug af Germline Variant Module kræver en minimal dækning pr. amplikon på 150x for at opnå nøjagtig variationsbestemmelse. Antallet af prøver og det samlede antal målbaser påvirker dækningen. CG-indholdet og andet genomindhold kan påvirke dækningen.
 - Variation i kopiantal kan påvirke, hvorvidt en variant bliver identificeret som homozygot eller heterozygot.
 - Variationer i bestemt repetitiv kontekst filtreres fra i VCF-filerne. RMxN-gentagelsesfilteret anvendes til at frasortere variationer, hvis hele eller dele af variationssekvensen er til stede gentagne gange i referencegenomet, der støder op til variationens position. Hvad angår bestemmelsen af kimcellevariationer, skal der være mindst 9 gentagelser i referencen, før en variation bliver filtreret, og kun gentagelser med en længde op til 5 bp tages i betragtning (R5x9).

- Specifikke somatiske begrænsninger:
 - MiSeqDx-systemet er designet til at levere kvalitative resultater vedrørende bestemmelse af somatiske variationer (dvs. forekomst af en somatisk variation med en variationsfrekvens over eller lig med 0,026 med en detektionsgrænse på 0,05) ved hjælp af Somatic Variant Module.
 - Brug af Somatic Variant Module kræver en minimal dækning pr. amplicon på 450x pr. oligonukleotidpulje for at opnå nøjagtig variationsbestemmelse. Antallet af prøver og det samlede antal målbaser påvirker dækningen. CG-indholdet og andet genomindhold kan påvirke dækningen.
 - Variationer i bestemt repetitiv kontekst filtreres fra i VCF-filerne. RMxN-gentagelsesfilteret anvendes til at frasortere variationer, hvis hele eller dele af variationssekvensen er til stede gentagne gange i referencegenomet, der støder op til variationens position. Hvad angår bestemmelsen af somatiske variationer, skal der være mindst 6 gentagelser i referencen, før variationen bliver filtreret, og kun gentagelser med en længde op til 3 bp tages i betragtning (R3x6).
 - Somatic Variant-modulet kan ikke skelne mellem kimcellevariationer og somatiske variationer. Modulet er designet til at påvise variationer på tværs af en række variationsfrekvenser, men variationsfrekvenser kan ikke anvendes til at skelne mellem somatiske variationer og kimcellevariationer.
 - Normalt væv i prøven påvirker påvisningen af varianter. Den rapporterede påvisningsgrænse er baseret på en variantfrekvens i forhold til det samlede DNA, der er ekstraheret fra både tumurvæv og normalt væv.

Produktets komponenter

Illumina MiSeqDx består af følgende:

MiSeqDx instrument (Katalognr. DX-410-1001)

Følgende softwarekomponenter er nødvendige for MiSeqDx-instrumentets drift og dataanalyse:

Softwareprogram	Funktion	Beskrivelse
MiSeq Operating Software (MOS)	Styrer driften af instrumentet	MOS-softwareprogrammet styrer driften af instrumentet under sekventeringen og genererer billeder til Real-Time Analysis (RTA)-softwaren. Se <i>MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v4 (Oversigtsvejledning til MiSeqDx-instrument til MOS v4)</i> (dokumentnr. 200010452) for yderligere oplysninger.
Real-Time Analysis (RTA)	Udfører primær analyse	RTA-softwareprogrammet konverterer de billeder, som MOS genererer af hver flise pr. cyklus i sekventeringskørslen, til filer til basebestemmelse, der fungerer som input til analysemodulerne i Local Run Manager. Softwareprogrammet RTA har ingen brugergrænseflade.

Softwareprogram	Funktion	Beskrivelse
Local Run Manager	Grænseflade til valg af modul	Local Run Manager-softwaren er integreret i instrumentet og anvendes til brugeradministration, udførelse af sekundære analyser og statusovervågning. Se <i>Local Run Manager v4 Software Guide for MiSeqDx (Vejledning til Local Run Manager v4-softwaren til MiSeqDx)</i> (dokumentnr. 200046657) for yderligere oplysninger.

Opbevaring og håndtering

Element	Specifikation
Temperatur	Transport og opbevaring: -10 °C til 40 °C (14 °F til 104 °F) Driftsbetingelser: 19 °C til 25 °C (66 °F til 77 °F)
Luftfugtighed	Transport og opbevaring: Ikke-kondenserende fugtighed Driftsbetingelser: 30-75 % relativ fugtighed (ikke-kondenserende)

Nødvendigt udstyr og nødvendige materialer, medfølger ikke

Sekvensering Forbrugsstoffer

MiSeqDx Reagent Kit v3 (katalognr. 20037124)

MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (katalognr. 20063860)

Brugerleverede materialer

Kontrollér, at du har følgende brugerleverede materialer, før du starter en kørsel.

Materiale	Formål
Spritservietter, 70 % isopropyl eller 70 % ethanol	Rengøring af flowcellens glas og holder
Laboratorieserviet, fnugfri	Rengøring af flowcelleholderen
Linsepapir, 4 x 6 in.	Rengøring af flowcellen
Tween 20	Afvaskning af instrumentet

Materiale	Formål
Pincet med flad ende, plastik (valgfrit)	Udtagning af flowcellen fra transportbeholderen
Vand i laboratoriekvalitet	Afvaskning af instrumentet

Retningslinjer for laboratorievand

Der skal altid anvendes vand af laboratoriekvalitet eller deioniseret vand til udførelse af procedurer på instrumentet. Brug aldrig postevand.

Anvend kun vand af følgende kvalitet eller tilsvarende:

- Deioniseret vand
- Illumina PW1
- 18 megohms (MΩ) vand
- Milli-Q-vand
- Super-Q-vand
- Vand af molekylærbiologisk kvalitet

Advarsler og forholdsregler



ADVARSEL

Dette reagenssæt indeholder potentielt farlige kemikalier. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Ventilation skal være egnet til håndtering af farlige materialer i reagenser. Anvend beskyttelsesudstyr, herunder briller, handsker og laboratoriekittel, der giver tilstrækkelig beskyttelse mod eksponeringsfaren. Anvendte reagenser skal håndteres som kemisk affald og bortskaffes i overensstemmelse med gældende regionale, nationale og lokale love og forordninger. Du kan finde yderligere miljø-, sundheds- og sikkerhedsrelaterede oplysninger i sikkerhedsdatabladet (SDS) på support.illumina.com/sds.html.

- Alle blodprøver skal håndteres som værende smitsomme med human immundefekt-virus (HIV), human hepatitis B-virus (HBV) eller andre blodbårne patogener (universelle forsigtighedsregler).
- Manglende overholdelse af de beskrevne fremgangsmåder kan resultere i fejlagtige resultater eller betydeligt nedsat prøve kvalitet.
- Overhold laboratoriets rutinemæssige forholdsregler. Må ikke pipetteres med munden. Der må ikke indtages mad og drikke eller ryges i arbejdsområderne. Anvend engangshandsker og laboratoriekittel i forbindelse med håndtering af prøver og reagenser. Vask hænderne grundigt efter håndtering af prøver og reagenser.

- Der skal anvendes korrekt laboratoriepraksis og god laboratoriehygiejne for at forhindre, at PCR-produkterne kontaminerer reagenser, instrumenter og genomiske DNA-prøver. PCR-kontaminering kan forårsage unøjagtige og upålidelige resultater.
- For at forhindre kontaminering skal det sikres, at de områder, der anvendes før og efter opformeringen, har udstyr og materialer, der er dedikeret til formålet (f.eks. pipetter, pipettespidser, varmeblokke, vortex-blandere og centrifugere).
- Hvor det er relevant, skal indeksprøveparringen svare nøjagtigt til det udskrevne pladelayout. Local Run Manager udfylder automatisk de indeksprimere, der er knyttet til prøvenavnene, når de indtastes i modulet. Brugeren bør kontrollere de indeksprimere, der er knyttet til prøverne, inden sekvenseringskørslen startes. Uoverensstemmelser mellem prøven og pladelayoutet resulterer i manglende positiv prøveidentifikation og ukorrekt resultatrapportering.
- Det tilrådes på det kraftigste at installere brugerleveret antivirus-software for at beskytte computeren mod vira. Se installationsvejledningen i brugermanualen.
- MiSeqDx må ikke betjenes, hvis et eller flere af panelerne er blevet fjernet. Betjening af instrumentet uden et eller flere af panelerne kan medføre eksponering for netspænding og DC-spænding.
- Rør ikke ved flowcelleholderen i flowcellekammeret. Varmelegemet i kammeret har en driftstemperatur på 22 °C til 95 °C og kan forårsage forbrændinger.
- Instrumentet vejer ca. 57,2 kg (126 lbs) og kan forårsage alvorlig skade, hvis det tabes eller håndteres forkert.
- Alle alvorlige hændelser, der er relateret til dette produkt, skal omgående indberettes til Illumina og de kompetente myndigheder i det medlemsland, hvori brugeren og/eller patienten er bosat.

Brugsvejledning

Denne brugervejledning til MiSeqDx-instrumentet foreskriver brug af de reagenser, der leveres i MiSeqDx Reagent Kit v3.

Opret kørsel med Local Run Manager

For detaljerede instruktioner i oprettelse af en kørsel henvises til *Local Run Manager v4 Software Guide for MiSeqDx (Vejledning til Local Run Manager v4-softwaren til MiSeqDx)* (dokumentnr. 200046657) og Local Run Manager modulevejledningen til det analysemodul, du bruger.

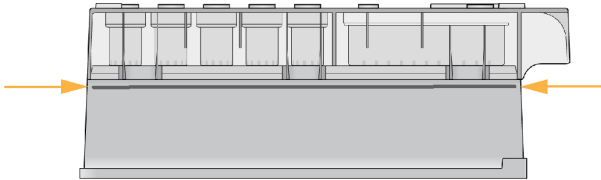
Klargøring af reagenskassetten

Instruktionerne nedenfor beskriver, hvordan man optør reagenserne i vandbad ved stuetemperatur.

1. Tag reagenskassetten ud af fryseren (-15 °C til -25 °C).

2. Anbring reagenskassetten i et vandbad, der indeholder tilstrækkeligt deioniseret vand med stuetemperatur til at dække bunden af reagenskassetten op til den vandlinje, der er trykt på reagenskassetten. Vandet må ikke overstige linjen for maksimalt vandindhold.

Figur 1 Linje for maksimalt vandindhold



3. Lad reagenskassetten optø i vandbadet med stuetemperatur i cirka 60-90 minutter, eller indtil den er helt optøet.
4. Tag kassetten op af vandbadet, og bank den forsigtigt mod laboratoriebænken for at fjerne vandet fra bunden af kassetten. Tør kassetens bund. Kontrollér, at der ikke er sprøjtet vand op på toppen af reagenskassetten.

Kontrol af reagenskassetten

1. Vend op og ned på reagenskassetten ti gange for at blande de optøede reagenser, og kontrollér, at alle positioner er optøet.
2. Kontrollér reagenser i position 1, 2 og 4 for at sikre, at de er helt blandede og ikke indeholder bundfald.

BEMÆRK Det er meget vigtigt, at reagenserne i kassetten er helt optøede og blandede for at sikre korrekt sekventering.

3. Bank forsigtigt kassetten mod laboratoriebænken for at fjerne luftbobler i reagenserne.

BEMÆRK MiSeqDx-sugerørene går ned til bunden af hvert reservoir for at suge reagenserne op, så det er vigtigt, at der ikke er luftbobler i reservoirerne.

4. Læg reagenskassetten på is, eller sæt den til side ved 2 °C til 8 °C (op til seks timer), indtil du er klar til at konfigurere kørslen. Fortsæt direkte til overførsel af prøven og konfiguration af kørslen for at opnå de bedste resultater.

Klargøring af prøver til sekventering

For anvisninger i klargøring af prøvebiblioteker til sekventering, herunder biblioteksfortyndning og puljeoprettelse, se brugervejledningsafsnittet i indlægssedlen i biblioteksklargøringspakken.

Fortyndingen af prøvebiblioteker afhænger af kompleksiteten af oligonukleotidpuljerne. MiSeqDx kræver optimering af clusterdensiteten. Den optimale clusterdensitet varierer, afhængigt af den specifikke biblioteksklargøringsanalyse.

Overførsel af prøvebiblioteker til kassetten

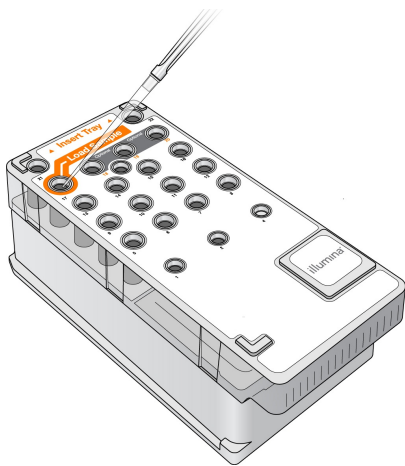
Når reagenskassetten er helt optøet og klar til brug, kan du overføre prøverne til kassetten.

1. Prik hul på folieforseglingen over reservoiret på den reagenskassette, der er mærket **Load Samples** (Overfør prøver) med en separat, ren og tom 1 ml pipettespids.

BEMÆRK Du skal ikke prikke hul på andre reagenspositioner. Der bliver automatisk prikket hul på de andre reagenspositioner under kørslen.

2. Pipetter prøvebibliotekerne indeholdende 600 µl klargjort fortyndet amplikonbibliotek (DAL) over i reservoiret **Load Samples** (Overfør prøver). Undgå kontakt med folieforseglingen.
3. Kontrollér reservoiret for luftbobler efter overførsel af prøven. Hvis der er luftbobler, skal du forsigtigt banke kassetten mod laboratoriebænken for at fjerne boblerne.

Figur 2 Overførsel af biblioteker



4. Gå direkte til trinnene med kørselskonfiguration via brugergrænsefladen i MiSeq Operating Software (MOS).

Kørselskonfiguration

Se *MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v4 (Oversigtsvejledning til MiSeqDx-instrument til MOS v4)* (dokumentnr. 200010452) for fuldstændige instruktioner om kørselsopsætning.

1. Log på MiSeqDx med din adgangskode til Local Run Manager-softwaren.
2. På startskærmen i MOS -softwaren, vælg **Sequence** (Sekventering).
3. Vælg en kørsel på listen, og vælg så **Next** (Næste).
En række skærbilleder til kørselsopsætning åbnes i følgende rækkefølge: Overførsel af flowcelle, overførsel af reagenser, gennemse og prækørselskontrol.
4. Når skærmen Load Flow Cell (Overførsel af flowcelle) kommer frem, skal du rengøre og overføre flowcellen.

5. Luk flowcellelåsen og døren til flowcellekammeret.
Både låsen og døren til kammeret skal lukkes, før kørslen starter. Når flowcellen er blevet overført, læser og registrerer softwaren RFID-mærket. Der bliver vist en bekræftelse på, at RFID'en er blevet læst, i nederste højre hjørne af skærmen.
6. Overfør flasken med MiSeqDx SBS Solution (PR2) i henhold til softwarens instruktioner, kontrollér, at affaldsflasken er tom, og overfør reagenskassetten.
Når flasken med MiSeqDx SBS Solution (PR2) og reagenskassetten er blevet overført, læser og registrerer softwaren RFID'en. Der bliver vist en bekræftelse på, at RFID'en er blevet læst, i nederste højre hjørne af skærmen.
7. Skærmen Sequencing (Sekvensering) åbner, når kørslen begynder. Skærmen giver et overblik over den igangværende kørsel, herunder intensiteter og kvalitetsscorer (Q-scorer).

Resultater

Real-Time Analysis (RTA) er en integreret software, der udfører billedanalyse og basebestemmelse og tildeler en kvalitetsscore til hver base for hver sekventeringscyklus. Når den primære analyse er færdig, begynder det modul på MiSeqDx-instrumentet, der blev valgt under [Opret kørsel med Local Run Manager på side 7](#), den sekundære analyse. Se den analysespecifikke dokumentation vedrørende andre arbejdsgange.

Kvalitetskontrolprocedurer

MiSeqDx-softwaren vurderer hver kørsel, prøve og basebestemmelse i forhold til kvalitetskontrolmålinger. Om nødvendigt skal de positive og negative kontroller i biblioteksklargøringen også vurderes i forhold til forventede resultater.

Karakteristika for ydeevne

Alle studier blev udført på MiSeqDx.

I kimcellestudierne blev der anvendt reagenser fra enten MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay eller TruSeq Custom Amplicon Kit Dx til biblioteksklargøringen. De to kit indeholder de samme biblioteksklargøringsreagenser og adskiller sig kun på ét punkt i arbejdsgangen: antallet af polymerasekædereaktionscyklusser (PCR-cyklusser) (henholdsvis 25 og 28). Det ekstra antal PCR-cyklusser muliggør et lavere DNA-input med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (50 ng) i forhold til MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay (250 ng), som påvist i DNA-input-studiet med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. De biblioteker, der blev klarlagt med MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay, blev sekventeret med de medfølgende sekventeringsreagenser i kittet. De biblioteker, der blev klarlagt med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, blev sekventeret med MiSeqDx Reagent Kit v3. Sidstnævnte sekventeringsreagenser har højere output end sekventeringsreagenserne i MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay.

Testen omfatter prøvegennemløbsområder, der understøttes af MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. MiSeqDx kan understøtte 1-96 prøver/kørsel, afhængigt af analysen. MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro er designet til at understøtte lavere prøvegennemløb inden for dette område for udvalgte analyser.

I de somatiske studier blev der anvendt TruSeq Custom Amplicon Kit Dx sammen med MiSeqDx Reagent Kit v3.

De beskrevne kimcelle-relaterede og somatiske arbejdsgange for TruSeq Custom Amplicon Kit Dx til klargøring af biblioteker til sekventering blev fulgt, herunder analyser i henholdsvis Germline Variant Module og Somatic Variant Module, med to undtagelser. I de studier, hvor det ene gen (kimcelle-relaterede ydelsesegenskaber; MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay) eller de to gener (somatiske ydelsesegenskaber) blev anvendt som repræsentative mutationspaneler, blev der anvendt analyse-specifikke arbejdsgange og analysemoduler.

BEMÆRK Amplikonets genomiske indhold angives i forhold til den sekventerede genomiske streng. For amplikoner, der er designet mod minus-strengen, er referencegenomindholdet det omvendte komplement (eksempel: PolyA-områder på minus-streng-amplikoner svarer til PolyT-områder på referencegenomet).

Definition af anvendte beregninger vedrørende ydelsesegenskaber

- Den positive procentvise overensstemmelse (PPA) er beregnet som den af analysen korrekt rapporterede andel af de loci, der er blevet klassificeret som varianter med en referencemetode.
 - $(\text{antal variantloci, som analysen rapporterer korrekt}) / (\text{samlet antal variantloci})$
Variantsloci, som analysen rapporterer i overensstemmelse med referencemetoden, er sandt positive (TP). Variationsloci, som analysen rapporterer som referencebestemmelser eller som andre variationsbestemmelser, er falsk negative (FN)
- Den negative procentvise overensstemmelse (NPA) er beregnet som den af analysen korrekt rapporterede andel af de loci, der er blevet klassificeret som vildtype med en referencemetode.
 - $(\text{antal vildtypeloci, som analysen rapporterer korrekt}) / (\text{samlet antal vildtypeloci})$
Vildtypeloci, som analysen rapporterer i overensstemmelse med referencemetoden, er sandt negative (TN). Vildtypeloci, som analysen rapporterer som variationer, er falsk positive (FP).
- Den samlede procentvise overensstemmelse (OPA) er beregnet som den af analysen korrekt rapporterede andel af loci i forhold til en referencemetode.
 - $((\text{antal variationsloci, som analysen rapporterer korrekt}) + (\text{antal vildtypeloci, som analysen rapporterer korrekt})) / ((\text{samlet antal variationsloci}) + (\text{samlet antal vildtypeloci}))$
- Hvad angår variationsbestemmelsesprogrammerne, inkluderer beregningerne af PPA, NPA og OPA ikke manglende bestemmelser (variations- eller referenceloci, der ikke opfylder et eller flere kvalitetsfiltre). I to studier er manglende bestemmelser specifikt inkluderet i målingen "% korrekte bestemmelser", og denne inkludering af manglende bestemmelser er noteret i de relevante tabeller.

- Bestemmelsesraten er beregnet som det samlede antal loci, der passerer filtrene, divideret med det samlede antal positioner, der er sekventeret for kromosom 1-22. X- og Y-kromosomer medtages ikke. Denne måling tager ikke hensyn til bestemmelsesernes overensstemmelse med referencemetoden.

Hvad angår ydelsesegenskaber relateret til præanalytiske faktorer (f.eks. ekstraktionsmetoder eller DNA-input), henvises der til indlægssedlen for den relevante biblioteksklargøringsmetode.

Prøveindeksering

Prøveindekseringsprimerne, som bliver tilføjet i løbet af biblioteksklargøringen, tildeler en unik sekvens til hvert prøve-DNA, hvilket gør det muligt at samle flere prøver i en enkelt sekventeringskørsel. Prøveindekseringen er både blevet afprøvet for den kimcellerelaterede og den somatiske arbejdsgang.

I alt 96 prøveindekser blev testet med en repræsentativ analyse, der var designet til at undersøge en række gener, der dækkede 12.588 baser pr. streng på tværs af alle 23 humane kromosomer, for at verificere analysens evne til konsekvent at give en genotypebestemmelse for en given prøve på tværs af forskellige indekseringsprimerkombinationer. Y-kromosomet indeholder ikke pålidelige områder og blev ikke vurderet. Otte unikke prøver blev testet med 12 forskellige indekseringsprimerkombinationer pr. prøve. Prøveresultaterne fra Germline Analysis Module blev sammenlignet med Platinum Genome-version 2016-01. PPA (SNV'er og indels) oversteg 97 % (sandt positive bestemmelser var mindst 70 for SNV'er, 38 for indsættelser, 36 for sletninger), og NPA var 100 % (mindst 23.440 referencepositioner pr. indeksskombination) for hver af de 96 indeksskombinationer. På uafhængig vis blev et enkelt-indeks testet for at verificere, at MiSeqDx Reagent Kit v3-sekventeringskemien kan understøtte mindre end otte prøver (den tidligere kemi i MiSeqDx Universal Kit 1.0 var begrænset til minimum otte prøver). Enkelt-indekset havde en PPA-værdi på 98,9 % (180/182) for SNV'er, 100 % (38/38) for indsættelser og 100 % (46/46) for sletninger. NPA var 100 % (23,856/23,856).

Tolv replikater (24 biblioteker) af en prøve blev testet for at måle indeks-nøjagtigheden med somatiske variationer ved hyppigheder fra 0,05-0,10 ved brug af Somatic Variant Module (der anvendes to indeksskombinationer pr. replikat til somatiske bestemmelser). PPA var 100 % for SNV'er (64/64), indsættelser (11/11) og sletninger (19/19). NPA var 100 % (mindst 11.590 referencepositioner pr. indeksskombination) for alle indeksskombinationer.

Prøveoverførsel

MiSeqDx-instrumentets arbejdsgang omfatter biblioteksklargøring og sekventering af flere prøver og kontroller, der alle bliver behandlet på en gang. Der er udført et prøveoverførselsstudie for at vurdere, om falsk positive resultater på grund af kontamineringsoverførsel fra brønd til brønd i forbindelse med klargøring af prøvebibliotek samt kontaminering fra kørsel til kørsel mellem fortløbende sekventeringskørsler har indvirkning på testresultaterne. Der blev anvendt somatiske variationer, eftersom de kan påvises ved hændelser med lavere allelfrekvens end kimcellevariationer.

Prøverne bestod af fire genomiske DNA-prøver fra cellelinjer, som hver indeholdt forskellige panelmutationer i en repræsentativ analyse af to gener. Prøverne var af en sådan karakter, at en mutation på en position i én prøve ville have en referencesequens (vildtype) i de andre prøver.

Overførsel fra brønd til brønd er defineret som en fejltilstand, der kan opstå i forbindelse med den manuelle håndtering (pipettering, prøveforveksling osv.). Der blev udført to testkørsler til vurdering af overførsel fra en prøvebrønd til en anden:

- Et skakbrætmonster med skiftevis en genomisk DNA-prøve (gDNA) med højt input, der indeholdt en mutation i gen 1, og en prøve med gDNA med lavt input, der indeholdt en mutation i gen 2.
- Et skakbrætmonster med skiftevis en gDNA-prøve med højt input, der indeholdt en mutation i gen 2, og en prøve med gDNA med lavt input, der indeholdt en mutation i gen 1.

I hver kørsel blev i alt 12 replikater vurderet for falsk positive bestemmelser (f.eks. rapportering af en mutation i gen 1 i en brønd, der indeholdt en prøve med en mutation i gen 2, eller omvendt).

Overførsel fra kørsel til kørsel er defineret som en fejltilstand, der kan opstå på grund af resterende materiale fra en tidligere sekventeringskørsel. For at klarlægge, om der sker overførsel mellem sekventeringskørsler, blev der klargjort og sekventeret to plader, som hver indeholdt 11 replikater af en enkelt unik prøve med gDNA med højt input og en blindprøve, umiddelbart efter hinanden på ét MiSeqDx-instrument og vurderet for falsk positive bestemmelser. Den første kørsel indeholdt 11 replikater af en prøve med en mutation i gen 2 og en blindprøve. Den anden kørsel indeholdt 11 replikater af en prøve med en mutation i gen 1 og en blindprøve. Biblioteket med prøven med en mutation i gen 2 blev sekventeret først, efterfulgt af en sekventeringskørsel med biblioteket med prøven med en mutation i gen 1, efterfulgt af endnu en sekventeringskørsel med biblioteket med prøven med en mutation i gen 2. Hvis der blev observeret mutation i gen 2 i en kørsel med et bibliotek med mutation i gen 1 alene, var det et udtryk for overførsel.

Der blev rapporteret nul falsk positive bestemmelser (0/24, 0 %) som følge af overførsel *fra brønd til brønd*. Alle forventede mutationer blev detekteret. Der blev rapporteret nul falsk positive bestemmelser (0/24, 0 %) som følge af overførsel *fra kørsel til kørsel*. Alle forventede mutationer blev detekteret. Der blev rapporteret nul falsk positive bestemmelser (0/48, 0 %) som følge af *total* overførsel (både fra brønd til brønd og fra kørsel til kørsel).

Kimcellerelaterede ydelsesegenskaber

I de nedenfor beskrevne studier blev der anvendt Germline Variant Module til analysering af sekventeringsdataene, med undtagelse af studierne med panelet med ét gen, hvor der blev anvendt et analysespecifikt modul.

Nøjagtighed

Der er udført følgende studie for at vurdere nøjagtigheden af MiSeqDx-instrumentet ved brug af MiSeqDx Reagent Kit v3 og DNA af høj kvalitet. I dette studie blev der anvendt en repræsentativ analyse, der var designet til at undersøge en række gener, der dækkede 12.588 baser på tværs af 23 forskellige kromosomer ved brug af 150 amplikoner. Y-kromosomet indeholder ikke pålidelige områder og blev ikke vurderet. De 12 unikke prøver, der blev anvendt i studiet, stammer fra en enkelt familie – to forældre (overordnede) og 10 børn (underordnede) – ofte sekventeret af flere laboratorier og med forskellige sekventeringsmetoder. Der er fem kvindelige prøver og syv mandlige prøver. Hver prøve blev testet i duplikat. Nøjagtigheden for SNV'er, indsættelser og sletninger blev bestemt ved at sammenligne studiedataene med en velkarakteriseret referencedatabase. Sekvensen fra referencedatabasen (Platinum Genomes version 2016-01) var afledt fra en kombination af flere forskellige sekventeringsmetoder, offentligt tilgængelige data og arvelige oplysninger. Pålidelige genomiske områder blev defineret på baggrund af denne referencemetode, medmindre andet er angivet. I alt blev prøverne kørt otte gange. Nøjagtighedstabellerne er baseret på dataene fra den første kørsel.

Tabel 1 viser studiedataene med positiv og negativ procentvis overensstemmelse pr. prøve, hvor variationsresultaterne bliver sammenlignet med den velkarakteriserede sammensatte referencemetode med henblik på PPA-beregninger. De tre varianttyper (SNV'er, insertioner og deletioner) er samlet. Fordi referencemetoden kun giver resultater vedrørende enkelt nukleotidvarianter og -indsættelser/-sletninger, bliver baseresultater uden varianter sammenlignet med det humane referencegenom hg19 med henblik på NPA-beregninger.

Tabel 1 Overensstemmelse for MiSeqDx-instrumentets basebestemmelsesresultater pr. prøve

Prøve	Gennemsnitlig bestemmelsesrate	Samlet antal variationer	Samlet antal TP-variationer	Samlet antal FN-variationer	Samlet antal manglende bestemmelser	Samlet antal TN-bestemmelser	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	152	152	0	4	24.024	100	100	100
NA12878	> 99,9	270	266	0	4	23.856	100	100	100
NA12879	> 99,9	192	190	1	1	24.054	99,5	100	> 99,9

Prøve	Gennemsnitlig bestemmelsesrate	Samlet antal variationer	Samlet antal TP-variationer	Samlet antal FN-variationer	Samlet antal manglende bestemmelser	Samlet antal TN- bestemmelser	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 repræsentative analyse bestod af 150 ampliconer, der var designet til at dække et bredt genomindhold. CG-indholdet i ampliconerne varierede fra 26 % til 87 %. Ampliconerne havde også en række enkeltnukleotid- (f.eks. PolyA, PolyT), dinukleotid- og trinukleotidgentagelser. Dataene blev kompileret pr. amplicon ([Tabel 2](#)) for at klarlægge genomindholdets indvirkning på procentdelen af korrekte bestemmelser. Procentdelen af korrekte bestemmelser består af variations- og referencebestemmelser og er under 100 %, hvis der er ukorrekte eller manglende bestemmelser. Manglende bestemmelse forekommer, hvis et eller flere filtre for variationsbestemmelse ikke bliver bestået (f.eks. utilstrækkelig dækning).

Syv ud af de otte FN-variationer i [Tabel 2](#) forekom med en indsættelse af 1 bp på amplicon 111, som også indeholder PolyA-homopolymer og et GC-indhold på 0,29. Den resterende FN (ukorrekt bestemmelse) skyldtes en forventet heterozygot SNV på amplicon 125 med et GC-indhold på 0,68, der blev bestemt som en homozygot variation. SNV-variationsfrekvensen var 0,71, altså over tærsklen på 0,70 for klassificering som homozygot variation. Ampliconet med den laveste procentdel af korrekte bestemmelser (98,2 %) var amplicon 17 med 40 manglende bestemmelser og indeholdende AT-gentagelser og et GC-indhold på 27 %.

Tabel 2 MiSeqDx-instrumentets nøjagtighed på ampliconniveau

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Samlet antal korrekte bestemmelser	Samlet antal ukorrekte bestemmelser	Samlet antal manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
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/T	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/T	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/T	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/T	0,29	1872	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Samlet antal korrekte bestemmelser	Samlet antal ukorrekte bestemmelser	Samlet antal manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
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/T	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/T	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/T	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/T	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/T	0,42	1992	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Samlet antal korrekte bestemmelser	Samlet antal ukorrekte bestemmelser	Samlet antal manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
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/T	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/T	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	I/T	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	I/T	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/T	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/T	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/T	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

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Samlet antal korrekte bestemmelser	Samlet antal ukorrekte bestemmelser	Samlet antal manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	2232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	I/T	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/T	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/T	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/T	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/T	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	Poly T (5), indel	0,37	2184	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	2136	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Samlet antal korrekte bestemmelser	Samlet antal ukorrekte bestemmelser	Samlet antal manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	2088	0	0	100
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/T	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/T	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	I/T	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	I/T	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	I/T	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	I/T	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

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Samlet antal korrekte bestemmelser	Samlet antal ukorrekte bestemmelser	Samlet antal manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	1584	0	0	100
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/T	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/T	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/T	0,52	1704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	I/T	0,55	0	0	0	I/T
149	Y	2655519	2655609	91	0	I/T	0,48	0	0	0	I/T
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	I/T

Variationer med manglende bestemmelse er opsummeret i [Tabel 3](#). De specifikke filtre, der resulterede i den manglende bestemmelse, er angivet i tabellen. Indsættelsen på amplikon 111 blev filtreret fra i ni ud af 16 tilfælde, og de resterende syv tilfælde blev bestemt som reference og er derfor FN.

Tabel 3 Oversigt over variationer med manglende bestemmelse

Amplikonnr.	Krom:Pos	Variation	Tilsvarende amplikon-indhold	Filter	Manglende variationer	Forventede varianter	FN-bestemmelser
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: Gentag filter. En variation bliver frafilteret, hvis hele eller dele af variationen er til stede gentagne gange i referencegenomet, der støder op til variationens position. Der skal være mindst ni gentagelser i referencen, og kun gentagelser med en længde op til 5 bp tages i betragtning.

Sekventeringsresultaterne af prøve NA12878 blev sammenlignet med en meget pålidelig genotype for NA12878, som er udviklet af National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). 92 ud af de 150 amplikoner var helt inden for genområderne med høj sikkerhed, 41 amplikoner havde delvis overlapning, og 17 amplikoner havde ingen overlapning i NIST-sekvensen. Dette resulterede i 10.000 koordinater pr. replikat til sammenligning. Basebestemmelser uden variationer blev sammenlignet med det humane referencegenom hg19. Resultaterne vedrørende nøjagtighed er vist i [Tabel 4](#).

Tabel 4 Overensstemmelse mellem MiSeqDx-instrumentets basebestemmelsesresultater af prøve NA12878 og NIST-databasen

Prøve	Antal amplikoner	Gennemsnitlig bestemmelsesrate	Samlet antal TP-variationer	Samlet antal FN-variationer	Samlet antal TN-bestemmelser	Samlet antal FP-bestemmelser	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19380	0	100	100	100

Prøverne blev desuden analyseret med henblik på bestemmelse af små indsættelser og sletninger (indels) ([Tabel 5](#)). I nogle tilfælde var indellen fælles mellem to eller flere prøver, som vist i kolonnen Samlet antal prøvereplikater med indel. Resultaterne for begge replikater af de 12 gyldige prøver er inkluderet i [Tabel 5](#). Der var i alt 71 indels, der varierede i størrelsen fra 1-24 bp for indsættelser og 1-25 bp for sletninger. 69 indels blev hver især detekteret med en positiv procentvis overensstemmelse på 100 %. En sletning (amplicon 64; sletning af 2 bp (chr10 55892600 TAC>T) havde ingen korrekte bestemmelser, fordi hver af disse varianter var en manglende bestemmelse på grund af R5x9-filteret. Derfor kunne PPA, som ikke udelukker nogen bestemmelser, ikke beregnes. En anden indel, indsættelse af 1 bp (chr17 39589692 C>CA på amplicon 111), havde heller ingen korrekte opkald, fordi ni varianter var en manglende bestemmelse på grund af R5x9-filteret og syv var FN-bestemmelser.

Tabel 5 Oversigt over indel-detektion med MiSeqDx-instrumentet

Amplikon Kromosom	Position	Analyseret fragmentstørrelse	Amplikon-indel, type og længde	Indel	Samlet antal prøvereplikater med indel	Antal manglende bestemmelser	Samlet antal ukorrekte indel-bestemmelser	Samlet antal korrekte indel-bestemmelser	PPA	
1	1	36450544	93	Sletning, 25 bp	GAAAATTTAATGAAACACATTGCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	Sletning, 3 bp	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	Indsættelse, 23 bp	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	Sletning, 17 bp	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	10	0	0	10	100

Amplikon Kromosom	Position	Analyseret fragmentstørrelse	Amplikon-indel, type og længde	Indel	Samlet antal prøvereplikater med indel	Antal manglende bestemmelser	Samlet antal ukorrekte indelbestemmelser	Samlet antal korrekte indelbestemmelser	PPA	
6	1	236372081	70	Indsættelse, 5 bp	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	Indsættelse, 3 bp	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	90	Indsættelse, 7 bp	T>TTTGGTAA	14	0	0	14	100
9	2	87003972	80	Sletning, 6 bp	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	87	Indsættelse, 5 bp	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	Indsættelse, 12 bp	C>CTGAAAATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	Indsættelse, 2 bp	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	Sletning, 23 bp	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	Indsættelse, 9 bp	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	Sletning, 1 bp	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	66	Sletning, 8 bp	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	Indsættelse, 11 bp	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	Sletning, 4 bp	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	Indsættelse, 8 bp	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	Sletning, 21 bp	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	Sletning, 3 bp	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32986905	95	Sletning, 25 bp	CTTTCACCTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	Sletning, 23 bp	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	Indsættelse, 1 bp	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	Sletning, 4 bp	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	Indsættelse, 1 bp	T>TC	24	0	0	24	100

Amplikon Kromosom	Position	Analyseret fragmentstørrelse	Amplikon-indel, type og længde	Indel	Samlet antal prøvereplikater med indel	Antal manglende bestemmelser	Samlet antal ukorrekte indelbestemmelser	Samlet antal korrekte indelbestemmelser	PPA
48	7	149503916	91	Sletning, 4 bp	GGATA>G	8	0	8	100
50	7	156476548	93	Sletning, 11 bp	GAATCTGCACTT>G	12	0	12	100
52	8	24811064	90	Sletning, 1 bp	AG>A	24	0	24	100
53	8	76518677	67	Indsættelse, 4 bp	T>TACTG	14	0	14	100
55	9	105586193	65	Indsættelse, 4 bp	C>CAATT	2	0	2	100
58	9	138995370	97	Sletning, 21 bp	TCTGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	14	0	14	100
59	10	5987158	79	Sletning, 3 bp	TAAC>T	10	0	10	100
63	10	45084202	95	Sletning, 16 bp	AGCGTCTATAACCAAT>A	12	0	12	100
64	10	55892600	89	Sletning, 2 bp	TAC>T	10	10	0	I/T
68	11	30177690	70	Indsættelse, 2 bp	C>CTG	10	0	10	100
70	11	59837721	62	Indsættelse, 8 bp	T>TTATGAAAA	12	0	12	100
75	11	118406328	85	Sletning, 8 bp	CAGTGTGGA>C	10	0	10	100
76	11	120357842	85	Sletning, 2 bp	CTT>C	10	0	10	100
78	12	2834814	84	Indsættelse, 21 bp	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	24	0	24	100
84	13	25817002	89	Indsættelse, 19 bp	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	24	0	24	100
85	13	44880152	89	Indsættelse, 4 bp	C>CCTGT	12	0	12	100
86	13	77665265	77	Sletning, 20 bp	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	14	0	14	100
89	14	46958967	73	Sletning, 22 bp	TTTAAATTTGAATGTGATAAAA>T	24	0	24	100
90	14	58050081	81	Indsættelse, 4 bp	C>CTGAT	20	0	20	100
91	14	82390602	91	Sletning, 16 bp	CTTGCTCTATAAACCGT>C	10	0	10	100
93	14	102808554	94	Sletning, 5 bp	CGTGGA>C	10	0	10	100
95	15	63446199	68	Sletning, 6 bp	CAAAATT>C	12	0	12	100
96	15	77879862	95	Sletning, 25 bp	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCCTCTTA>G	14	0	14	100

Amplikon Kromosom	Position	Analyseret fragmentstørrelse	Amplikon-indel, type og længde	Indel	Samlet antal prøvereplikater med indel	Antal manglende bestemmelser	Samlet antal ukorrekte indelbestemmelser	Samlet antal korrekte indelbestemmelser	PPA	
98	15	85438311	72	Indsættelse, 3 bp	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	Indsættelse, 4 bp	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	Sletning, 7 bp	ATTATTTCT>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	Sletning, 1 bp	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	Indsættelse, 18 bp	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	Indsættelse, 4 bp	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	Indsættelse, 1 bp	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	84	Indsættelse, 24 bp	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	Sletning, 4 bp	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	79	Sletning, 12 bp	TTTGTATCTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38837054	75	Indsættelse, 22 bp	T>TGTATCTTAGCAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	Indsættelse, 3 bp	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	85	Sletning, 2 bp	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	70	Sletning, 15 bp	TACTTGAGAACTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	101	Indsættelse, 5 bp	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50897361	67	Indsættelse, 11 bp	G>GGAATGTCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	Sletning, 16 bp	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	Indsættelse, 11 bp	G>GATAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	Sletning, 21 bp	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	Sletning, 5 bp	GTTGT>G	8	0	0	8	100

Amplikon Kromosom	Position	Analyseret fragmentstørrelse	Amplikon-indel, type og længde	Indel	Samlet antal prøvereplikater med indel	Antal manglende bestemmelser	Samlet antal ukorrekte indelbestemmelser	Samlet antal korrekte indelbestemmelser	PPA
140	22	25750814	100	Indsættelse, 6 bp	C>CAGGGCA	20	0	20	100
142	22	37409885	97	Indsættelse, 5 bp	C>CTGTTT	2	0	2	100
144	22	47081407	92	Sletning, 10 bp	GGGCACAGGCA>G	12	0	12	100

Reproducerbarhed

Der er udført to studier til vurdering af reproducerbarheden med MiSeqDx-instrumentet med cellerlinjer (studie 1 og 2) eller leukocyt-depleteret blod tilsat cellerlinjer (studie 2). Studie 1 blev udført ved hjælp af flere forskellige instrumenter. Studie 2 blev udført på flere forskellige laboratorier.

Studie 1

Reproducerbarheden for MiSeqDx-instrumentet blev bestemt ved brug af to instrumenter, to operatører og to reagenspartier, hvilket gav otte kørsler i alt. Den repræsentative analyse, prøverne og referencemetoden er de samme som dem, der er beskrevet for nøjagtighedsstudiet.

Resultaterne er anført pr. amplikon for hvert instrument [Tabel 6](#) for at vise reproducerbarheden af bestemmelser på tværs af instrumenter. % korrekte bestemmelser omfattede både ukorrekte og manglende bestemmelser (manglende beståelse af et eller flere filtre for variationsbestemmelse). Instrumenterne generede stort set samme antal manglende bestemmelser og ukorrekte bestemmelser, afhængigt af det pågældende amplikon.

Tabel 6 Resultater vedrørende reproducerbarhed fra MiSeqDx-instrument til MiSeqDx-instrument (amplikonniveau)

Amplikon Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			
							Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	
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
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	8736	0	0	8736	0	0

Amplikon Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			
							Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	
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/T	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/T	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/T	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

Amplikon Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			
							Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	
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/T	0,29	7488	0	0	7488	0	0
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/T	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/T	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/T	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	8448	0	0	8448	0	0

Amplikon Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			
							Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	
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/T	0,31	6336	0	0	6336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	I/T	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/T	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/T	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	I/T	0,51	7776	0	0	7776	0	0

Amplikon Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			
							Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	
67	11	8159816	8159912	97	96	I/T	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/T	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/T	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/T	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
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/T	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/T	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/T	0,25	7968	0	0	7968	0	0

Amplikon Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			
							Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	
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/T	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	I/T	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

Amplikon Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			
							Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	
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/T	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/T	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	I/T	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	I/T	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	I/T	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	I/T	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

Amplikon Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			
							Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	
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/T	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/T	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/T	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	I/T	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2655519	2655609	91	0	I/T	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Resultaterne af reproducerbarhedsstudiet blev analyseret pr. operatør ved hjælp af variationsfrekvensen [Tabel 7](#). Analysen viste, at variationsfrekvenserne var konsistente på tværs af operatørerne. De gennemsnitlige variationsfrekvenser +/- 1 standardafvigelse er anført.

Tabel 7 Resultater fra operatør til operatør med MiSeqDx-instrumentet

Variationsfrekvensinterval	Antal unikke variationer	Samlet antal variationer analyseret af operatør 1	Samlet antal variationer analyseret af operatør 2	Gennemsnitlig (SD) rapporteret variationsfrekvens, operatør 1	Gennemsnitlig (SD) rapporteret variationsfrekvens, 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

Reproducerbarhedsstudiets resultater for hver prøve er vist samlet for alle otte kørsler [Tabel 8](#). Påvisningen er evalueret for hver variationstype – SNV'er, Indsættelser og sletninger – separat. Referenceplaceringer er ikke medtaget. Denne analyse viste, at resultaterne for variationerne var reproducerbare på tværs af prøverne.

Tabel 8 Overensstemmelse for MiSeqDx-instrumentets basebestemmelsesresultater pr. prøve

Prøve	SNV'er					Insertioner					Deletioner			
	Samlet antal	Samlet antal TP	Samlet antal FP	Samlet antal FN	Samlet antal	Samlet antal TP	Samlet antal FP	Samlet antal FN	Samlet antal	Samlet antal TP	Samlet antal FP	Samlet antal 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	1	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	1		
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		
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		

De data, der blev frembragt ved de otte kørsler i dette reproducerbarhedsstudie, understøtter erklæringen om, at MiSeqDx-instrumentet er i stand til konsekvent sekventering af:

- GC-indhold ≥ 19 % (alle bestemte baser i 192 ud af 192 sekventerede amplikoner med et CG-indhold på 19 % blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på 1,1 %)
- GC-indhold ≤ 78 % (alle bestemte baser i 192 ud af 192 sekventerede amplikoner et CG-indhold på 78 % blev korrekt bestemt med nul manglende bestemmelser)
- PolyA-længder ≤ 8 (PolyA-gentagelse af 8 nukleotider blev korrekt bestemt i 192 ud af 192 sekventerede amplikoner indeholdende PolyA = 8)
- PolyT-længder ≤ 10 (PolyT-gentagelse af 10 nukleotider blev korrekt bestemt i 192 ud af 192 sekventerede amplikoner indeholdende PolyT = 10)
- PolyG-længder ≤ 7 (PolyG-gentagelse af 7 nukleotider blev korrekt bestemt i 192 ud af 192 sekventerede amplikoner indeholdende PolyG = 7)
- PolyC-længder ≤ 6 (PolyC-gentagelse af 6 nukleotider blev korrekt bestemt i 576 ud af 576 sekventerede amplikoner indeholdende PolyC = 6)
- Dinukleotidgentagelseslængder $\leq 11x$ (alle bestemte baser i 192 ud af 192 sekventerede amplikoner med 11x dinukleotidgentagelse blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på 0,5 %)
- Trinukleotidgentagelseslængder $\leq 5x$ (alle bestemte baser i 192 ud af 192 sekventerede amplikoner med 5x trinukleotidgentagelse blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på 0,5 %)
- 24 eller færre baseindsættelser og 25 eller færre basesletninger
 - 24-basers indsættelser blev korrekt bestemt i 192 ud af 192 prøver
 - 25-basers sletninger blev korrekt bestemt i 223 prøver og fejlbestemt i 1 prøve ud af 224 prøver

Studie 2

Der er udført et studie af reproducerbarheden fra laboratorium til laboratorium med en repræsentativ analyse, Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139 Variant Assay, der inkluderede et undersæt af klinisk signifikante genetiske variationer i *CFTR*, der blev analyseret med MiSeq Reporter-softwaren ved brug af arbejdsgangen for targeteret DNA-sekventering på MiSeqDx Platform. Studiet var blindet og blev udført på 3 forsøgscentre med 2 operatører på hvert center. To velkarakteriserede paneler med hver 46 prøver blev testet af hver operatør på hvert center, hvilket gav i alt 810 bestemmelser pr. center. Panelerne indeholdt en blanding af genomisk DNA fra cellelinjer med kendte variationer i *CFTR*-genet og leukocyt-depleteret blod, der var tilsat cellelinjer med kendte variationer i *CFTR*-genet.

Blodprøverne blev leveret således, at det var muligt at inkorporere ekstraktionstrinnene til klargøring af gDNA, der udgør det primære input i arbejdsgangen for analysen. Prøvebeståelsesraten, defineret som antallet af prøver, der bestod QC-målingerne første gang, var 99,88 %. Alle testresultater er baseret på initial testning.

Tabel 9 Oversigt over resultaterne af reproducerbarhedsstudiet udført med den repræsentative analyse MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

Panel	Prøvenr.	Prøvens genotype	Variationer Samlet antal bestemmelser pr. center	Overensstemmende positive bestemmelser (variationer)			Overensstemmende negative bestemmelser (vildtype)			Antal fejlbestemmelser r	Antal manglende bestemmelser	Positiv overensstemmels e (%)	Negativ overensstemmels e (%)	Samlet overensstemmels e (%)
				Center			Center							
				1	2	3	1	2	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
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

Panel	Prøvenr.	Prøvens genotype	Variationer	Samlet antal bestemmelser pr. center	Overensstemmende positive bestemmelser (variationer)			Overensstemmende negative bestemmelser (vildtype)			Antal fejlbestemmelser	Antal manglende bestemmelser	Positiv overensstemmelse (%)	Negativ overensstemmelse (%)	Samlet overensstemmelse (%)
					Center 1	Center 2	Center 3	Center 1	Center 2	Center 3					
					1	2	3	1	2	3					
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C ikke til stede	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/T	100	100

Panel	Prøvenr.	Prøvens genotype	Variationer	Samlet antal bestemmelser pr. center	Overensstemmende positive bestemmelser (variationer)			Overensstemmende negative bestemmelser (vildtype)			Antal fejlbestemmelse r	Antal manglende bestemmelser	Positiv overensstemmels e (%)	Negativ overensstemmels e (%)	Samlet overensstemmels e (%)
					Center			Center							
					1	2	3	1	2	3					
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	I/T	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/T	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

Panel	Prøvenr.	Prøvens genotype	Variationer	Samlet antal bestemmelser pr. center	Overensstemmende positive bestemmelser (variationer)			Overensstemmende negative bestemmelser (vildtype)			Antal fejlbestemmelser	Antal manglende bestemmelser	Positiv overensstemmelse (%)	Negativ overensstemmelse (%)	Samlet overensstemmelse (%)
					Center			Center							
					1	2	3	1	2	3					
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	I/T	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/T	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	I/T	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/T	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/T	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/T	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

Panel	Prøvenr.	Prøvens genotype	Variationer	Samlet antal bestemmelser pr. center	Overensstemmende positive bestemmelser (variationer)			Overensstemmende negative bestemmelser (vildtype)			Antal fejlbestemmelser	Antal manglende bestemmelser	Positiv overensstemmelses (%)	Negativ overensstemmelses (%)	Samlet overensstemmelses (%)
					Center			Center							
					1	2	3	1	2	3					
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/T	100	100
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/T	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

Panel	Prøvenr.	Prøvens genotype	Variationer	Samlet antal bestemmelser pr. center	Overensstemmende positive bestemmelser (variationer)			Overensstemmende negative bestemmelser (vildtype)			Antal fejlbestemmelser	Antal manglende bestemmelser	Positiv overensstemmelse (%)	Negativ overensstemmelse (%)	Samlet overensstemmelse (%)
					Center			Center							
					1	2	3	1	2	3					
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/T	100	100
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
I alt				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

¹ Vildtypelokationen svarende til variation N1303K for ét replikat resulterede i en manglende bestemmelse på grund af utilstrækkelig dækning.

² Ét replikat af prøve 5 og 75 havde en bestemmelsesrate på 0 %. Yderligere undersøgelse tyder på, at prøverne ikke var blevet tilføjet til prøvepladen før biblioteksklargøringen, eftersom de prøvevoluminer, der var tilbage i rørene, stemte overens med, at der ikke var fjernet nogen volumen.

³ Dokumentationen tyder på, at operatøren sandsynligvis byttede om på prøve 9 og 10 inden biblioteksklargøringen.

⁴ Vildtypelokationen svarende til variation M1V for ét replikat af hver af to prøver resulterede i en manglende bestemmelse på grund af utilstrækkelig dækning.

Somatiske ydelsesegenskaber

I de nedenfor beskrevne studier blev der anvendt Somatic Variant Module til analysering af sekventeringsdataene, med undtagelse af studierne med panelet med to gener, hvor der blev anvendt et analysespecifikt modul.

Nøjagtighed

Der er udført tre studier til vurdering af nøjagtigheden af MiSeqDx-instrumentet med DNA, der er ekstraheret fra FFPE-prøver.

Studie 1

I dette studie blev der anvendt en repræsentativ analyse, der var designet til at undersøge en række gener, der dækkede 12.588 baser på tværs af 23 forskellige kromosomer ved brug af 150 amplikoner. Y-kromosomet indeholder ikke pålidelige områder og blev ikke vurderet. De fem unikke prøver, der blev anvendt i studiet, stammer fra en enkelt familie – to forældre (overordnede) og tre børn (underordnede) – ofte sekventeret af flere laboratorier og med forskellige sekventeringsmetoder. Der er tre kvindelige prøver og to mandlige prøver. Alle prøverne blev formalinfikseret og indstøbt i paraffin før ekstraktion af DNA til studiet. Prøve GM12877 blev fortyndet på DNA-niveau med prøve GM12878 for at skabe GM12877-D med henblik på at frembringe et sæt variationer med hyppigheder tæt på 5 % og 10 %. Hver prøve blev testet i duplikat, undtagen GM12877-D, som blev testet i fem replikater. Nøjagtigheden for SNV'er, indsættelser og sletninger blev bestemt ved at sammenligne studiedataene med en velkarakteriseret referencedatabase. Sekvensen fra referencedatabasen (Platinum Genomes version 2016-01) var afledt fra en kombination af flere forskellige sekventeringsmetoder, offentligt tilgængelige data og arvelige oplysninger. Pålidelige genomiske områder blev defineret på baggrund af denne referencemetode, medmindre andet er angivet. I alt blev prøverne kørt otte gange. Nøjagtighedstabellerne er baseret på dataene fra den første kørsel.

Tabel 10 viser studiedataene med positiv og negativ procentvis overensstemmelse pr. prøve, hvor variationsresultaterne bliver sammenlignet med den velkarakteriserede sammensatte referencemetode med henblik på PPA-beregninger. De tre varianttyper (SNV'er, insertioner og deletioner) er samlet. Fordi referencemetoden kun giver resultater vedrørende enkelt nukleotidvarianter og -indsættelser/-sletninger, bliver baseresultater uden varianter sammenlignet med det humane referencegenom hg19 med henblik på NPA-beregninger.

Tabel 10 Overensstemmelse mellem MiSeqDx-instrumentets basebestemmelsesresultater og referencedataene for 6 velkarakteriserede prøver

Prøve	Gennemsnitlig bestemmelsesrate	Samlet antal variationer	Samlet antal TP-variationer	Samlet antal FN-variationer	Samlet antal TN-bestemmelser	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

Prøve	Gennemsnitlig bestemmelsesrate	Samlet antal variationer	Samlet antal TP-variationer	Samlet antal FN-variationer	Samlet antal TN-bestemmelser	PPA	NPA	OPA
GM12877-D ¹	98,4	675	650	0	57608	100	100	100
GM12877-D ²		155	155	0		100	100	100

¹ Variationer med en frekvens over 20 %.

² Variation med en frekvens under 20 %.

De 150 ampliconer var designet til at dække et bredt genomindhold. CG-indholdet i ampliconerne varierede fra 26 % til 87 %. Ampliconerne havde også en række enkeltnukleotid- (f.eks. PolyA, PolyT), dinukleotid- og trinukleotidgentagelser. Der blev anvendt 6 unikke prøver i analysen. Dataene blev kompileret pr. amplicon (Tabel 11) for at klarlægge genomindholdets indvirkning på procentdelen af korrekte bestemmelser. Procentdelen af korrekte bestemmelser består af variations- og referencebestemmelser og er under 100 %, hvis der er ukorrekte eller manglende bestemmelser. Manglende bestemmelse forekommer, hvis et eller flere filtre for variationsbestemmelse ikke bliver bestået (f.eks. utilstrækkelig dækning). Der var ingen ukorrekte bestemmelser. Antallet af manglende bestemmelser varierede betydeligt mellem ampliconerne. GC-indhold og diverse interaktioner med GC-indhold var de mest signifikante prædiktorer for manglende bestemmelse. 2040/2580 (79 %) af de manglende bestemmelser skyldtes manglende opfyldelse af dækningspecificationer. Ampliconer med GC-indhold over 78 % resulterede i de fleste manglende bestemmelser. Et repræsentativt amplicon med et CG-indhold på 78 % havde i alt 675 manglende bestemmelser. Et repræsentativt amplicon med et CG-indhold på 87 % havde i alt 1365 manglende bestemmelser. Dækningen kan øges ved at reducere antallet af prøver, der overføres til flowcellen, hvilket kan muliggøre påvisning af ampliconer med højt GC-indhold.

Tabel 11 Data vedrørende nøjagtighed på ampliconniveau

Amplicon	Kromosom	Amplicon, Start	Amplicon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Ampliconets genomindhold	GC-indhold	Samlet antal korrekte bestemmelser	Samlet antal ukorrekte bestemmelser	Samlet antal manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
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

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Samlet antal korrekte bestemmelser	Samlet antal ukorrekte bestemmelser	Samlet antal manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
10	2	177016721	177016805	85	81	I/T	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/T	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/T	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/T	0,29	1169	0	1	99,9
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/T	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/T	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

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Samlet antal korrekte bestemmelser	Samlet antal ukorrekte bestemmelser	Samlet antal manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
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/T	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/T	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/T	0,42	1245	0	0	100
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/T	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/T	0,49	1200	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Samlet antal korrekte bestemmelser	Samlet antal ukorrekte bestemmelser	Samlet antal manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
66	10	118351373	118351453	81	81	I/T	0,51	1215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	I/T	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/T	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/T	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/T	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
80	12	30881766	30881846	81	81	I/T	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/T	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/T	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

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Samlet antal korrekte bestemmelser	Samlet antal ukorrekte bestemmelser	Samlet antal manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
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/T	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/T	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	Poly T (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
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/T	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

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Samlet antal korrekte bestemmelser	Samlet antal ukorrekte bestemmelser	Samlet antal manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	1275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	I/T	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	I/T	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	I/T	0,68	1110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	I/T	0,64	1050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	I/T	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	Poly G (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
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/T	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/T	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/T	0,52	1065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	I/T	0,55	0	0	0	I/T
149	Y	2655519	2655609	91	0	I/T	0,48	0	0	0	I/T
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	I/T

Variationer med manglende bestemmelse er opsummeret i [Tabel 12](#). De specifikke filtre, der resulterede i den manglende bestemmelse, er angivet i tabellen.

Tabel 12 Oversigt over variationer med manglende bestemmelse

Amplikonnr.	Krom:Pos	Variation	Tilsvarende amplikon-indhold	Filter	Manglende variationer	Forventede varianter
28	5:1882129	T > G	78 % GC	LowDP 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	LowDP	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 LowDP: Lav dækning. En variation bliver frafiltreret, hvis dybden i mindst én af puljerne på denne specifikke position er under 900.

² R3x6: Gentag filter. En variation bliver frafiltreret, hvis hele eller dele af variationen er til stede gentagne gange i referencegenomet, der støder op til variationens position. Der skal være mindst seks gentagelser i referencen, og kun gentagelser med en længde op til 3 bp tages i betragtning.

Sekventeringsresultaterne af prøven blev sammenlignet med en meget pålidelig genotype for NA12878, som er udviklet af National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). 92 ud af de 150 amplikoner var helt inden for genområderne med høj sikkerhed, 41 amplikoner havde delvis overlapning, og 17 amplikoner havde ingen overlapning i NIST-sekvensen. Dette resulterede i 10.000 koordinater pr. replikat til sammenligning. Basebestemmelser uden varianter blev sammenlignet med det humane referencegenom hg19. Resultaterne vedrørende nøjagtighed er vist i [Tabel 13](#).

Tabel 13 Overensstemmelse mellem MiSeqDx-instrumentets basebestemmelsesresultater og NIST-databasen for prøve GM12878

Prøve	Antal amplikoner	Gennemsnitlig bestemmelsesrate	Samlet antal TP-variationsbestemmelser	Samlet antal FN-variationsbestemmelser	Samlet antal TN-bestemmelser	Samlet antal FP-bestemmelser	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19231	0	100	100	100

De fem uførtynkede prøver blev desuden analyseret med henblik på bestemmelse af små indsættelser og sletninger (indels) ([Tabel 14](#)). I nogle tilfælde var indellen fælles mellem to eller flere prøver, som vist i kolonnen Samlet antal prøvereplikater med indel. Resultaterne for begge replikater af de fem prøver er inkluderet i [Tabel 14](#). Der var i alt 71 indels, der varierede i størrelsen fra 1-24 bp for indsættelser og 1-25 bp for sletninger. 68 indels blev hver især detekteret med en positiv procentvis overensstemmelse på 1. Tre indsættelser og sletninger havde ingen korrekte bestemmelser, fordi hver af disse varianter var en manglende bestemmelse på grund af R3x6-fileret. Derfor kunne PPA, som udelukker manglende bestemmelser, ikke beregnes. De tre variationer var sletning af 1 bp (krom8 24811064 AG>A), sletning af 2 bp (krom10 55892600 TAC>T) og sletning af 1 bp (krom17 39589692 C>CA).

Tabel 14 Oversigt over indel-detektion med MiSeqDx-instrumentet

Amplikon	Kromosom	Position	Analysert fragmentstørrelse	Amplikon-indel, type og længde	Indel	Samlet antal prøvereplikater med indel	Antal manglende bestemmelser	Samlet antal ukorrekte indel-bestemmelser	Samlet antal korrekte indel-bestemmelser	PPA
1	1	36450544	93	Sletning, 25 bp	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	Sletning, 3 bp	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	Indsættelse, 23 bp	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	Sletning, 17 bp	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	Indsættelse, 5 bp	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	Indsættelse, 3 bp	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	Indsættelse, 7 bp	T>TTTGATA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	Sletning, 6 bp	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	Indsættelse, 5 bp	T>TTAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	Indsættelse, 12 bp	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	Indsættelse, 2 bp	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	Sletning, 23 bp	TAACTTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	Indsættelse, 9 bp	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	Sletning, 1 bp	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	Sletning, 8 bp	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	Indsættelse, 11 bp	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	Sletning, 4 bp	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	Indsættelse, 8 bp	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	Sletning, 21 bp	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	Sletning, 3 bp	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	Sletning, 25 bp	CTTTCACCTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	Sletning, 23 bp	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	Indsættelse, 1 bp	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	Sletning, 4 bp	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	Indsættelse, 1 bp	T>TC	15	0	0	15	100

Amplikon	Kromosom	Position	Analiseret fragmentstørrelse	Amplikon-indel, type og længde	Indel	Samlet antal prøvereplikater med indel	Antal manglende bestemmelser	Samlet antal ukorrekte indel-bestemmelser	Samlet antal korrekte indel-bestemmelser	PPA
48	7	149503916	91	Sletning, 4 bp	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	Sletning, 11 bp	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	Sletning, 1 bp	AG>A	15	15	0	0	I/T
53	8	76518677	67	Indsættelse, 4 bp	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	Indsættelse, 4 bp	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	Sletning, 21 bp	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	Sletning, 3 bp	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	Sletning, 16 bp	AGCGTCTATAACCAAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	Sletning, 2 bp	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	Indsættelse, 2 bp	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	Indsættelse, 8 bp	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	Sletning, 8 bp	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	Sletning, 2 bp	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	Indsættelse, 21 bp	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	Indsættelse, 19 bp	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	Indsættelse, 4 bp	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	Sletning, 20 bp	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	Sletning, 22 bp	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	Indsættelse, 4 bp	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	Sletning, 16 bp	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	Sletning, 5 bp	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	Sletning, 6 bp	CAAAT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	Sletning, 25 bp	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	Indsættelse, 3 bp	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	Indsættelse, 4 bp	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	Sletning, 7 bp	ATTATTC>A	11	0	0	11	100

Amplikon Kromosom	Position	Analiseret fragmentstørrelse	Amplikon-indel, type og længde	Indel	Samlet antal prøvereplikater med indel	Antal manglende bestemmelser	Samlet antal ukorrekte indel-bestemmelser	Samlet antal korrekte indel-bestemmelser	PPA
107	17	3594276	87	Sletning, 1 bp	TG>T	13	0	13	100
108	17	3970133	91	Indsættelse, 18 bp	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	11	100
109	17	16084985	93	Indsættelse, 4 bp	A>AACAC	7	0	7	100
111	17	39589692	84	Indsættelse, 1 bp	C>CA	13	13	0	100
112	17	39589739	84	Indsættelse, 24 bp	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	15	100
113	17	45438886	92	Sletning, 4 bp	CAGTG>C	7	0	7	100
114	17	61502459	79	Sletning, 12 bp	TTTGTATCTGCTG>T	13	0	13	100
120	18	38837054	75	Indsættelse, 22 bp	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	15	0	15	100
121	18	47405425	81	Indsættelse, 3 bp	T>TGAG	11	0	11	100
122	18	54815706	85	Sletning, 2 bp	ACT>A	13	0	13	100
130	20	21766863	70	Sletning, 15 bp	TACTTGAGAACTGAGG>T	9	0	9	100
131	20	25278464	101	Indsættelse, 5 bp	A>AGTGGG	13	0	13	100
132	20	50897361	67	Indsættelse, 11 bp	G>GGAATGTCAGCC	15	0	15	100
134	20	62690925	87	Sletning, 16 bp	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	9	100
135	21	30300873	66	Indsættelse, 11 bp	G>GATAAACTTTA	9	0	9	100
137	21	36710749	87	Sletning, 21 bp	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	9	100
138	21	46644985	69	Sletning, 5 bp	GTTGTT>G	13	0	13	100
140	22	25750814	100	Indsættelse, 6 bp	C>CAGGGCA	13	0	13	100
142	22	37409885	97	Indsættelse, 5 bp	C>CTGTTT	13	0	13	100
144	22	47081407	92	Sletning, 10 bp	GGGCACAGGCA>G	7	0	7	100

Studie 2

I dette studie blev der anvendt deponerede FFPE-vævsprøver med colorektal cancer og en repræsentativ to-gens analyse, som blev sammenlignet med referencemetoden, bidirektional Sanger-sekventering (Sanger). 441 ud af de i alt 1.183 forsøgsdeltagere havde gyldige resultater af Sanger og den repræsentative analyse. Ved vurdering på forsøgsdeltagerniveau (Tabel 15) var 230 ud af de 441 forsøgsdeltagere positive ved Sanger (mutation påvist ved Sanger). Blandt disse var 227 positive ved den repræsentative analyse. De

resterende 211 ud af de 441 forsøgsdeltagere var negative ved Sanger (ingen mutation påvist ved Sanger). Blandt disse var 206 negative ved den repræsentative analyse. Det resulterede i en positiv procentvis overensstemmelse (PPA) på 98,7 % og en negativ procentvis overensstemmelse (NPA) på 97,6 % (Tabel 15).

Tabel 15 Positiv og negativ procentvis overensstemmelse for resultater på forsøgsdeltagerniveau

Repræsentativ analyse	Sanger		I alt
	Positive	Negative	
Positive	227 ¹	5	232
Negative	3 ²	206	209
I alt	230	211	441

Ydeevne Resumé		
Overensstemmelse Statistik	Punktestimat	Præcis 95 % CI
PPA	227/230 = 98,7 %	[96,2 %, 99,7 %]
NPA	206/211 = 97,6 %	[94,6 %, 99,2 %]

¹Der var 224 eksakte match for resultaterne på intraindividuel niveau for alle mutationer. Hos to forsøgsdeltagere påviste MiSeqDx den mutation, der blev påvist ved Sanger, og en yderligere mutation. Hos én forsøgsdeltager påviste MiSeqDx og Sanger forskellige mutationer.

²En forsøgsdeltager fik påvist to mutationer ved Sanger. To forsøgsdeltagere fik påvist én mutation ved Sanger.

Studie 3

I dette studie blev der foretaget en vurdering af DNA-biblioteker, der blev klargjort ved hjælp af FFPE-prøver fra flere forskellige vævstyper. I alt 109 FFPE -prøver fra otte forskellige typer væv (tyktarm, æggestok, bugspytkirtel, binyre, blære, lever, skjoldbruskkirtel og bryst) med mindst 11 FFPE -prøver fra hver vævstype). Binyrevæv omfattede metastaser fra tumorer i øsofagus, lunger og colon. Det øvrige væv havde primære tumorer. I dette studie blev der anvendt et repræsentativt analysedesign til at undersøge 26 gener, der dækkede 21.577 baser på tværs af 17 forskellige kromosomer. I alt seks forskellige gener (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* og *BRAF*) blev Sanger-sekventeret. Der blev Sanger-sekventeret 1-3 gener for hver tumor, afhængigt af den forventede prævalens af somatiske mutationer for den pågældende tumor. Sanger-sekventeringen resulterede i identifikation af 39 somatiske SNV-mutationer i 33 ud af 109 FFPE -prøver. MiSeqDx identificerede 36 somatiske SNV-mutationer i 32 ud af 109 FFPE -prøver og havde én falsk-negativ og to

manglende bestemmelser af variationsposition. PPA var 97,3 %. MiSeqDx identificerede 78.975 referencebaser på tværs af de 109 FFPE-prøver og havde 29 falsk positive i forhold til Sanger-sekventeringen og 3.416 manglende bestemmelser. NPA var 99,9 %. Der var konkordans mellem de to metoder, hvad angik en sletning af 2 baser. Resultaterne er opsummeret efter vævstype i [Tabel 16](#).

Tabel 16 Positiv og negativ procentvis overensstemmelse efter vævstype

Vævstype	Antal prøver	Samlet antal variationer	Samlet antal TP-variationer	Samlet antal FN-variationer	Samlet antal TN-bestemmelser	Samlet antal FP-bestemmelser	Samlet antal manglende bestemmelser	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
Colon	11	6	5	0	8720	2	133	100	>99,9
Lever	13	3	3	0	7984	1	59	100	>99,9
Ovarie	13	7	7	0	10581	1	724	100	>99,9
Pancreas	17	7	7	0	11929	12	489	100	99,9
Thyreoida	11	3	3	0	7429	1	652	100	>99,9
I alt	109	39	36	1	78975	29	3416	97,3	>99,9

Reproducerbarhed

Der er udført to studier til vurdering af reproducerbarheden med MiSeqDx-instrumentet med DNA, der er ekstraheret fra FFPE -prøver. Studie 1 blev udført ved hjælp af flere forskellige instrumenter. Studie 2 blev udført på flere forskellige laboratorier.

Studie 1

Reproducerbarheden for MiSeqDx-instrumentet blev bestemt ved brug af to instrumenter og to uddannede operatører, der udførte otte kørsler i alt. Den repræsentative analyse, amplikonets genomindhold, prøverne og referencemetoden er de samme som dem, der er beskrevet for nøjagtighedsstudie 1 ovenfor. Resultaterne er anført pr. amplikon for hvert instrument [Tabel 17](#) for at vise reproducerbarheden af bestemmelser på tværs af instrumenter. % korrekte bestemmelser omfattede både ukorrekte og manglende bestemmelser (manglende beståelse af et eller flere filtre for variationsbestemmelse). Instrumenterne generede stort set samme antal manglende bestemmelser, afhængigt af det pågældende amplikon. Der blev observeret en enkelt forkert bestemmelse inden for et sikkert område som defineret af referencestandard for Platinum Genomes for MiSeqDx 1. Den ukorrekte bestemmelse bestod af en falsk positiv bestemmelse af en indsættelse i amplikon 64 ved undersøgelse af kromosom 10 på position 55892599 til 55892687. Amplikonet havde en dinukleotidgentagelse på 11.

Tabel 17 Resultater vedrørende reproducerbarhed fra MiSeqDx-instrument til MiSeqDx-instrument (amplikonniveau)

Amplikon	Kromosom	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser
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/T	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
14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	I/T	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/T	0,43	4980	0	0	4980	0	0

Amplikon	Kromosom	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser
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/T	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/T	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/T	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

Amplikon	Kromosom	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser
38	6	98	98	Poly T (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/T	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/T	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/T	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/T	0,49	5760	0	0	5760	0	0
57	9	83	83	AT(3)	0,37	4973	0	7	4978	0	2

Amplikon	Kromosom	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser
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
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/T	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	I/T	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	I/T	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/T	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/T	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/T	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	Poly A (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

Amplikon	Kromosom	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser
79	12	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	5577	0	3	5573	0	7
80	12	81	81	I/T	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/T	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
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/T	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/T	0,36	5460	0	0	5460	0	0

Amplikon	Kromosom	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser
100	15	70	70	Indel	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	I/T	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
111	17	84	82	Poly A (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/T	0,37	5460	0	0	5460	0	0
119	18	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9

Amplikon	Kromosom	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser
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/T	0,48	3900	0	0	3900	0	0
124	19	99	99	I/T	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	I/T	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	I/T	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	I/T	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
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/T	0,68	5819	0	1	5819	0	1

Amplikon	Kromosom	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser	Korrekte bestemmelser i alt	Ukorrekte bestemmelser i alt	Samlet antal manglende bestemmelser
142	22	97	97	Indel	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	I/T	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/T	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	Y	65	0	I/T	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	I/T	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Resultaterne af reproducerbarhedsstudiet blev analyseret pr. operatør ved hjælp af variationsfrekvensen [Tabel 18](#). Analysen viste, at variationsfrekvenserne var konsistente på tværs af operatørerne. De gennemsnitlige variationsfrekvenser +/- 1 standardafvigelse er anført.

Tabel 18 Resultater fra operatør til operatør med MiSeqDx-instrumentet

Variationsfrekvensinterval	Antal unikke variationer	Samlet antal variationer analyseret af operatør 1	Samlet antal variationer analyseret af operatør 2	Gennemsnitlig (SD) rapporteret variationsfrekvens, operatør 1	Gennemsnitlig (SD) rapporteret variationsfrekvens, operatør 2
Høj frekvens (~100 %)	1112	1072	1072	0,96 +/- 0,05	0,96 +/- 0,05
Middel 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

Reproducerbarhedsstudiets resultater for hver prøve er vist samlet for alle otte kørsler [Tabel 19](#). Påvisningen er evalueret separat for hver variationstype – SNV'er, indsættelser og sletninger separat. Referencepositioner er ikke medtaget. Denne analyse viste, at resultaterne for variationerne var reproducerbare på tværs af prøverne.

Tabel 19 Overensstemmelse for MiSeqDx-instrumentets basebestemmelsesresultater pr. prøve

Prøve	SNV'er				Inserationer				Deletioner			
	Samlet antal	Samlet antal TP	Samlet antal FP	Samlet antal FN	Samlet antal	Samlet antal TP	Samlet antal FP	Samlet antal FN	Samlet antal	Samlet antal TP	Samlet antal FP	Samlet antal 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

¹Variationer med en frekvens over 20 %.

²Variation med en frekvens under 20 %.

De data, der blev frembragt ved de 8 kørsler i dette reproducerbarhedsstudie, understøtter erklæringen om, at MiSeqDx-instrumentet er i stand til konsistent sekventering af:

- GC-indhold \geq 19 % (alle bestemte baser i 120 ud af 120 sekventerede ampliconer med et CG-indhold på 19 % blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på 3,4 %)
- GC-indhold \leq 73 % (alle bestemte baser i 120 ud af 120 sekventerede ampliconer med et CG-indhold på 73 % blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på 0,1 %)
- PolyA-længder \leq 8 (PolyA-gentagelse af 8 nukleotider blev korrekt bestemt i 120 ud af 120 sekventerede ampliconer indeholdende PolyA = 8)
- PolyT-længder \leq 10 (PolyT-gentagelse af 10 nukleotider blev korrekt bestemt i 120 ud af 120 sekventerede ampliconer indeholdende PolyT = 10)

- PolyG-længder ≤ 6 (PolyG-gentagelse af 6 nukleotider blev korrekt bestemt i 720 ud af 720 sekventerede ampliconer indeholdende PolyG =6)
- PolyC-længder ≤ 6 (PolyC-gentagelse af 6 nukleotider blev korrekt bestemt i 359 ud af 360 sekventerede ampliconer indeholdende PolyC = 6, og der var 1 manglende bestemmelse)
- Dinukleotidgentagelseslængder $\leq 4x$ (alle bestemte baser i 600 ud af 600 sekventerede ampliconer med 4x dinukleotidgentagelse blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på 0,4 %)
- Trinukleotidgentagelseslængder $\leq 5x$ (alle bestemte baser i 120 ud af 120 sekventerede ampliconer med 5x trinukleotidgentagelse blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på 1,9 %)
- 24 eller færre baseindsættelser og 25 eller færre basesletninger
 - 24-basers indsættelser blev korrekt bestemt i 120 ud af 120 prøver
 - 25-basers sletninger blev korrekt bestemt i 182 prøver og rapporteret som manglende bestemmelse i 2 prøver ud af 184 prøver

Studie 2

Der blev udført et eksternt studie til vurdering af reproducerbarheden af den repræsentative analyse af to gener, der er beskrevet under nøjagtighedsstudie 2, på tværs af tre eksterne testcentre (to operatører pr. center), et reagensparti og tre ikke-sammenhængende testdage. Testningen blev udført med seks velkarakteriserede prøvepaneler med genomiske DNA-prøver fra kliniske FFPE-prøver eller -cellelinjer. Hvert panel bestod af 10 elementer, dvs. 60 elementer i alt.

De 60 panelelementer bestod af duplikater af fire unikke vildtypeprøver (for panelmutationer), 12 unikke mutationsprøver (med en enkelt mutation), der var klargjort ved både høje og lave mutationsfrekvensniveauer, og to unikke mutationsprøver (med en enkelt mutation), der kun var klargjort ved en lav mutationsfrekvens. Hver unikke prøve/mutationsfrekvensniveauprøve (testet i duplikat i hver kørsel) havde 36 mulige resultater (2 replikater \times 2 operatører \times 3 dage \times 3 centre), hvis alle resultater var gyldige.

Procentdelen af forventede bestemmelser (PEC) på tværs af alle positive og negative variationer blev vurderet ved at sammenligne den repræsentative analyses resultat med det forventede mutationsresultat (forventet mutation detekteret eller ikke detekteret) for hver prøve. PEC er beregnet som 100 % gange antallet af forventede bestemmelser divideret med antallet af forsøgte bestemmelser. Det to-sidede 95 % konfidensinterval er beregnet med Wilson Score-metoden.

Prøvebeståelsesraten for centrene samlet set var $\geq 94,7$ % for den første kørsel af prøven eller i prøver, der blev testet i kørsler, der var gyldige første gang. PEC på mutationsniveau på tværs af alle mutationsprøver var 99,6 % (905/909) (95 % CI; 98,9, 99,8). Antallet af forsøgte bestemmelser på tværs af alle 56 panelmutationer (uanset om en detekteret mutation var forventet eller ej) for alle gyldige

prøver var 58.856 (56×1051). Ud af disse 58.856 observationer på mutationsniveau var der kun seks tilfælde, hvor det observerede og det forventede resultat ikke stemte overens. PEC på mutationsniveau på tværs af alle positive og negative variationer fra alle mutations- og vildtype-panelementer samlet set var 99,99 % ($58.850/58.856$).

Analysefølsomhed (blindgrænse [LoB] og detektionsgrænse [LoD])

I dette studie blev analysens skæringsværdi kontrolleret, og detektionsgrænsen (LoD) for MiSeqDx blev fastlagt ved hjælp af et repræsentativt panel. De velkarakteriserede Platinum Genome-cellelinjer GM12878 og GM12877 blev formalinfikseret og indstøbt i paraffin, hvorefter der blev ekstraheret DNA. GM12878 blev fortyndet med GM12877 således, at variationsfrekvenserne for 70 variationer (52 SNV'er, 9 indsættelser og 9 sletninger) var nær 0,05. De to DNA-prøver blev testet af to operatører ved brug af to instrumenter og to reagenspartier; i alt 10 sekventeringskørsler på MiSeqDx. Dette resulterede i 40 replikater for hver variation i GM12878 og 60 replikater for hvert tilsvarende vildtype-koordinat i GM12877 for hvert reagensparti. LoB og LoD blev beregnet ved brug af den klassiske, ikke-parametriske metode i CLSI EP17-A2. LoB og LoD blev beregnet for SNV'er, indsættelser og sletninger separat ved at samle variationshyppighederne for en given variationstype. Type I-fejl var defineret som 0,01, og type II-fejl var defineret som 0,05.

For LoB blev de samlede variationsfrekvenser sorteret fra lavest til højest, og den 99. position for hvert reagensparti for hver variationstype blev beregnet (Tabel 20). MiSeqDx-softwaren anvender en skæringsværdi (effektiv LoB) på 0,026 variationsfrekvens til at bestemme den kvalitative påvisning af variationer. Den beregnede blindgrænse bekræftede, at denne skæringsværdi resulterer i en type I-fejl på højst 0,01.

Tabel 20 Blindgrænse

Variationstype	Samlet antal variationsfrekvenser	LoB reagensbatch 1 (%)	LoB reagensbatch 2 (%)
SNV	3120	0,87	0,75
Insertion	540	0,79	0,60
Deletion	540	0,96	0,84

For LoD blev procentdelen af individuel mutationsfrekvens for hvert reagensparti for hver variationstype under skæringsværdien på 0,026 beregnet (Tabel 21). Eftersom procentdelene var lavere end type II-fejlen på 5 % (0,05), blev medianen af de samlede variationsfrekvenser beregnet som LoD (Tabel 21). LoD for hver variationstype blev bestemt på baggrund af den højeste af de to beregnede værdier for de to reagenspartier: 5,45 % for SNV'er, 4,88 % for indsættelser og 5,44 % for sletninger.

Tabel 21 Detektionsgrænse

Reagensparti	Variationstype	Samlet antal variationsfrekvenser	Antal VF-målinger < 2,6 %	Antal VF-målinger < 2,6 %	Detektionsgrænse (%)
1	SNV	2080	4	0,20	5,45
	Insertion	360	0	0,00	4,86
	Deletion	360	2	0,60	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Insertion	360	0	0,00	4,88
	Deletion	360	0	0,00	5,24

Følgende studier viser MiSeqDx-instrumentets ydelsesegenskaber med en anden repræsentativ analyse, der er målrettet mod 56 mutationer i to klinisk relevante cancergener (mutationspanel). Mutationspanelet er specifikt designet til detektion af 56 mutationer i to kliniske relevante cancergener (gen 1 og gen 2). Analysen bestemmer samtidig, om hver af de 56 mutationer er til stede eller fraværende i hver sekventeret prøve. Referencemetoden i disse studier var bidirektionel Sanger-sekventering.

Præcision fra parti til parti

Der er udført et studie af præcisionen fra parti til parti for at vurdere MiSeqDx-instrumentets ydeevne på tværs af fremstillede partier af reagenskit (bestående af prøvequalificerings-, biblioteksklargøring- og sekventeringsreagenser) ved brug af den repræsentative analyse af to gener og et panel med fem blandede FFPE-prøver, der opfyldte kravene til prøvequalificering. Hver FFPE-prøve indeholdt to unikke mutationer: en på et lavt (cirka 8 %) mutationsfrekvensniveau og en på et højt (cirka 14 %) mutationsfrekvensniveau. Der blev indhentet tolv (12) observationer af hver af de fem prøveblandinger over tre ikke-sammenhængende dage med tre partier reagenskit. Det samlede antal observationer i studiet på tværs af alle reagenspartier var 180 observationer på tværs af alle prøveblandinger og 360 observationer på tværs af alle mutationsfrekvensniveauer. På tværs af alle partier og dage viste 99,7 % (359/360) af observationerne det forventede mutationsresultat. Én lavfrekvensmutation blev ukorrekt bestemt som vildtype. Der blev gennemført en varianskomponentanalyse for hver mutation/mutationsfrekvensniveau for at vurdere systemets variabilitet. Den totale standardafvigelse varierede fra 0,011 til 0,029. Reagensparti-komponenten af den totale standardafvigelse varierede fra 0 til 0,015.

Revisionshistorik

Dokument nr.	Dato	Beskrivelse af ændring
Dokumentnr. 200006218 v02	Oktober 2023	Opdaterede referencer til Local Run Manager for version 4. Opdaterede mærkningen for at tilføje oplysninger om australsk sponsor. Korrigerede uoverensstemmelser, hvor indlægssedlen ikke stemmer overens med rapporten om instrumentverifikationsundersøgelser for MiSeqDx.
Dokumentnr. 200006218 v01	Maj 2022	Tilføjede at indlægssedlen til MiSeqDx Reagent Kit v3 CN til medfølgende udstyr og materialer ikke er påkrævet. Tilføjet testoplysninger for MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro til ydeevnekarakteristika. Fjernede USA-specifikke advarsler fra Advarsler og forholdsregler.
Dokumentnr. 200006218 v00	November 2021	Første udgivelse til understøttelse af MOS v4.0 og Local Run Manager v3.0.

Patenter og varemærker

Dette dokument og dets indhold er ophavsretligt beskyttet af Illumina, Inc. og dets datterselskaber ("Illumina") og er udelukkende beregnet til kundens kontraktmæssige brug i forbindelse med anvendelsen af de produkter, som er beskrevet heri, og til intet andet formål. Dette dokument og dets indhold må ikke bruges eller distribueres til noget andet formål og/eller på anden måde kommunikeres, offentliggøres eller reproduceres på nogen som helst måde uden forudgående, skriftligt samtykke fra Illumina. Med dette dokument udsteder Illumina ingen licens under sit patent, varemærke, sin copyright eller sædvaneret eller lignende rettigheder for nogen tredjeparter.

Anvisningerne i dette dokument skal følges nøje og fuldstændigt af kvalificerede og behørigt uddannede medarbejdere for at sikre, at det produkt eller de produkter, der er beskrevet heri, anvendes korrekt og sikkert. Alt indhold i dette dokument skal læses grundigt og forstås inden brug af produktet/produkterne.

HVIS ALLE ANVISNINGERNE HERI IKKE GENNEMLÆSES FULDT UD OG FØLGES NØJE, KAN DET MEDFØRE SKADE PÅ PRODUKTET ELLER PRODUKTERNE, SKADE PÅ PERSONER, HERUNDER BRUGERE ELLER ANDRE, OG SKADE PÅ ANDEN EJENDOM OG VIL GØRE ENHVER GARANTI GÆLDENDE FOR PRODUKTET ELLER PRODUKTERNE UGYLDIG.

ILLUMINA PÅTAGER SIG INTET ANSVAR SOM FØLGE AF FORKERT BRUG AF DET PRODUKT ELLER DE PRODUKTER, DER ER BESKREVET HERI (HERUNDER DELE HERAF ELLER SOFTWARE).

© 2023 Illumina, Inc. Alle rettigheder forbeholdes.

Alle varemærker tilhører Illumina, Inc. eller de respektive ejere. Specifikke varemærkeoplysninger er tilgængelige på www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktoplysninger



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (uden for Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE



EC REP



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

Australsk sponsor

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

Produktmærkning

Du kan finde en fyldestgørende forklaring på de symboler, der kan fremgå af produktemballagen og -mærkningen, i symbolforklaringen på support.illumina.com under fanen *Dokumentation* for det relevante sæt.