

MiSeqDx[®]-instrument

FÖR IN VITRO-DIAGNOSTISKT BRUK

Katalognr DX-410-1001

Avsedd användning

MiSeqDx-instrumentet är avsett för riktad sekvensering av DNA-bibliotek från humant genomiskt DNA extraherat från perifert helblod eller formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad (FFPE), när den används med *in vitro*-diagnostiska analyser (IVD) på instrumentet. MiSeqDx-instrumentet är inte avsett för helgenom eller *de novo*-sekvensering. MiSeqDx-instrumentet ska användas med registrerade och listade, reglerade eller godkända IVD-reagenser och analysprogramvara.

Grundläggande principer

Illumina MiSeqDx är avsett för riktad omsekvensering av humant DNA med förbrukningsmaterial för sekvensering från Illumina och bibliotek preparerade med humant genomiskt DNA extraherat från perifert helblod eller FFPE-vävnad med registrerade och listade, reglerade eller godkända IVD-reagenser. Bibliotek prepareras genom att amplifiera mål, lägga till provindex och smala in sekvenser. Provbibliotek fångas upp i en flödescell och sekvenseras av instrumentet med hjälp av SBS-kemi (sekvensering genom syntes). I SBS-kemi används en metod med reversibel terminator för att detektera enkelnukleotidbaser medan de införlivas i växande DNA-strängar. Programvaran för realtidsanalys (RTA) utför bildanalys och basbestämning samt tilldelar en kvalitetspoäng till varje bas för varje sekvenseringscykel. När den primära analysen har slutförts kommer den sekundära analysen på MiSeqDx-instrumentet att bearbeta basbestämningarna. Bearbetningen omfattar demultiplexering, generering av FASTQ-filer, inpassning, variantbestämning och generering av Variant Call Format-filer (VCF) som innehåller information om de varianter som finns på särskilda positioner i ett referensgenom. MiSeqDx använder olika moduler för sekundär analys beroende på arbetsflöde. Det finns moduler med arbetsflöden för variantbestämning (köns-cell eller somatisk) samt moduler för specifika analyser.

Dubbel startkonfiguration

Den dubbla startkonfigurationen inkluderar maskinvaru-, programvaru- och installationsprocedurer som gör det möjligt för MiSeqDx-instrumentet att köra både *in vitro*-diagnostik (IVD) och RUO-sekvenseringsanalyser (endast för forskningsbruk). Med den dubbla startkonfigurationen kan användaren växla mellan instrumentets diagnosläge och forskningsläge. RFID-etiketter på förbrukningsmaterialerna för sekvensering förhindrar att RUO-sekvenseringsreagenserna används för diagnostiska sekvenseringskörningar.

Begränsningar

- 1 För *in vitro*-diagnostiskt bruk.
- 2 Resultaten på etiketten erhöles med representativa analyspaneler som använde perifert helblod eller cellinjer för köns-cellsprestanda och FFPE-vävnad, eller FFPE-cellinjer för somatisk prestanda med de beskrivna reagenserna och programvarumodulerna. Prestandaegenskaper anges endast i informationssyfte. Det valideringstest som visas, som krävs enligt de specifika kontrollerna för DNA-sekvensanalysator med hög genomströmning, ger endast en uppfattning om instrumentets allmänna kapacitet och bekräftar inte instrumentets kapacitet eller lämplighet med avseende på specifika påståenden. Alla diagnostiska tester som utvecklats för att användas på den här instrumentet kräver fullständig validering för alla prestandaaspekter.
- 3 Produkten har följande begränsningar:
 - Utdata från sekvensering ≥ 5 Gb.
 - Avläsningar som passerar filtret ≥ 15 miljoner.
 - Avläsningens längd (i paired end-körning) 2×150 bp.

- Baser över Q30 \geq 80 % vid en avläsningslängd 2 x 150 bp.
80 % eller fler av baserna har Phred-kvalitetspoäng över 30, vilket indikerar att basbestämningens noggrannhet överstiger 99,9 %.
- 4 MiSeqDx-instrumentet har endast validerats för att sekvensera humana DNA-bibliotek extraherade från perifert helblod och FFPE-vävnad. Bibliotek som genereras från andra provtyper bör inte användas med det här instrumentet för *in vitro*-diagnostik. Instrumentets prestanda för sekvensering av mikrobiella nukleinsyror från kliniska prover har inte fastställts.
- 5 MiSeqDx är avsett för *in vitro*-diagnostik med registrerade och listade, reglerade eller godkända IVD-reagenser eller -analyser. MiSeqDx-instrumentet kan användas för *in vitro*-diagnostik med följande IVD-analyser eller registrerade reagenser.

Namn	Katalognr	Bipacksedelns dokumentnr
Praxis® Extended RAS Panel (endast USA)	20012431	1000000037190
MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay	DX-102-1004 DX-102-1003	15038347
Klinisk MiSeqDx-sekvenseringsanalys av cystisk fibros	DX-102-1001	15038344
TruSeq Custom Amplicon Kit Dx	20005718	1000000029772
MiSeqDx reagenskit v3	20012552/20037124	1000000030849

Universella reagensbegränsningar och prestandaegenskaper som beskrivs i den här bipacksedeln baseras på representativa analyser. Läs bipacksedeln för specifika analyser för information om avsedd användning, detekterade varianter och provtyp för IVD-analyser.

- 6 Indels (insertioner, deletioner och kombinationer av sådana) som är längre än 25 bp riktas inte in av analysprogrammet. Det innebär att indels med en längd som är större än 25 bp inte detekteras av analysprogrammet.
- 7 Systemet har validerats för detektion av enkla nukleotida varianter (SNV:er) och upp till 25 bp-deletioner och 24 bp-insertioner när det används med modulerna Germline Variant (Könsellsvariant) och Somatic Variant (Somatisk variant). För somatisk bestämning med en variantfrekvens på 0,05 detekterades 25 bp-deletioner och 18 bp-insertioner.
- 8 Amplikonavläsningar med extremt variantinnehåll passas eventuellt inte in av analysprogrammet, vilket medför att regionen rapporteras som vildtyp. Här följer några exempel på sådant extremt innehåll:
 - Avläsningar som innehåller fler än tre indels.
 - Avläsningar av längder på minst 30 bp med SNV-innehåll som är större än 4 % av den totala amplikonmållängden (exklusive sondregioner).
 - Avläsningar av längder som är mindre än 30 bp med SNV-innehåll som är större än 10 % av den totala amplikonlängden (inklusive sondregioner).
- 9 Större varianter, som multinukleotider (MNV:er) och större indels, kan komma att rapporteras som separata mindre varianter i VCF-utdatafilen.
- 10 Deletionsvarianter kan filtreras eller missas när de sträcker sig över två överlappande amplikoner om deletionens längd är större än eller lika med överlappningen mellan amplikoner.
- 11 Systemet kan inte detektera indels om de angränsar direkt till en primer och det inte finns någon överlappande amplikon. För områden med överlappande amplikoner kan analysen inte detektera deletioner när området med överlappningen är mindre än den deletion som ska detekteras. Om exempelvis det överlappande området mellan två intilliggande amplikoner är två (2) baser kan analysen inte detektera några deletioner som inkluderar båda baserna. En enbas-deletion vid endera av baserna kan detekteras.
- 12 Liksom med alla hybridiseringsbaserade arbetsflöden för beredning av bibliotek kan underliggande polymorfismer, mutationer, insertioner eller deletioner i oligonukleotidbindande regioner påverka de alleler som undersöks och följaktligen de bestämningar som görs under sekvensering. Här följer några exempel:
 - En variant i fas med en variant i primerregionen amplifieras eventuellt inte, vilket ger ett falskt negativt resultat.
 - Varianter i primerregionen kan förhindra amplifiering av referensallelen, vilket medför en felaktig homozygot variantbestämning.

- Indelvarianter i primerregionen kan eventuellt orsaka en falsk positiv bestämning i slutet av avläsningen intill primern.
- 13 Indels kan eventuellt filtreras på grund av strängbias om de finns nära slutet av en läsning och mjukklippas under inpassning.
- 14 Små MNV:er har inte validerats.
- 15 Kopietalsvarianter eller strukturella varianter, till exempel fusioner eller translokationer, har inte validerats.
- 16 Begränsningarna nedan gäller specifikt för könsceller:
- MiSeqDx-systemet som använder modulen Germline Variant (Könscellsvariant) är utformad för att ge kvalitativa resultat för bestämning av könscellsvarianter (t.ex., homozygot, heterozygot, vildtyp).
 - Vid användning med modulen Germline Variant (Könscellsvariant) krävs en minsta täckning per amplikon på 150x för korrekt variantbestämning. Antalet prover och det totala antalet målbaser påverkar täckningen. GC-innehåll och annat genomiskt innehåll kan påverka täckningen.
 - Variation i antalet kopior kan påverka huruvida en variant identifieras som homozygot eller heterozygot.
 - Varianter i vissa repetitiva sammanhang filtreras bort i VCF-filerna. RMxN-upprepningsfiltret används för att filtrera varianter om hela eller en del av variantsekvensen upprepas i referensgenomet som angränsar till variantens position. För bestämning av könscellsvarianter krävs minst 9 upprepningar i referensen för att en variant ska filtreras, och endast upprepningar med en längd på upp till 5 bp beaktas (R5x9).
- 17 Begränsningarna nedan gäller specifikt för Somatic:
- MiSeqDx-systemet, tillsammans med modulen Somatic Variant (Somatisk variant), är utformat för att ge kvalitativa resultat vid bestämning av somatiska varianter (dvs. närvaro av en somatisk variant med en variantfrekvens på 0,026 och en detekteringsgräns på 0,05).
 - Vid användning med modulen Somatic Variant (Somatisk variant) krävs en minsta täckning per amplikon på 450x per oligonukleotiduppsättning för korrekt variantbestämning. Antalet prover och det totala antalet målbaser påverkar täckningen. GC-innehåll och annat genomiskt innehåll kan påverka täckningen.
 - Varianter i vissa repetitiva sammanhang filtreras bort i VCF-filerna. RMxN-upprepningsfiltret används för att filtrera varianter om hela eller en del av variantsekvensen upprepas i referensgenomet som angränsar till variantens position. För bestämning av somatiska varianter krävs minst 6 upprepningar i referensen för att en variant ska filtreras, och endast upprepningar med en längd på upp till 3 bp beaktas (R3x6).
 - Modulen Somatic Variant (Somatisk variant) kan inte skilja mellan könscellsvarianter och somatiska varianter. Modulen är utformad för att detektera varianter med ett antal olika variantfrekvenser, men variantfrekvens kan inte användas för att skilja mellan somatiska varianter och könscellsvarianter.
 - Normal vävnad i provet påverkar detekteringen av varianter. Den rapporterade detekteringsgränsen baseras på en variantfrekvens som förhåller sig till det totala DNA som extraheras från både tumörvävnad och normal vävnad.

Produktkomponenter

Illumina MiSeqDx består av följande:

MiSeqDx-instrument (katalognr DX-410-1001)

Följande programvarukomponenter krävs för att använda MiSeqDx-instrumentet och utföra dataanalyser:

Programvara	Funktion	Beskrivning
MiSeq-systemprogramvara (MOS)	Styr drift av instrumentet.	Programvaran MOS styr instrumentets drift under sekvensering och genererar bilder som används av programvaran för realtidsanalys (RTA). Mer information finns i <i>Referenshandbok för MiSeqDx-instrument med MOS v2 (dokumentnr 1000000021961)</i> .

Programvara	Funktion	Beskrivning
Programvaran för realtidsanalys (RTA)	Utför primär analys.	Programvaran RTA konverterar bilderna som genereras av MOS för varje ruta per cykel av sekvenseringskörningen till basbestämningsfiler, som utgör indata för analysmodulerna i Local Run Manager. Programvaran RTA innehåller inget användargränssnitt.
Local Run Manager	Gränssnitt för val av modul.	Programvaran Local Run Manager är en integrerad lösning i instrument för användarhantering, sekundär analys och övervakning av status. Mer information finns i <i>Referensguide för Local Run Manager-programvaran för MiSeqDx</i> (dokumentnr 100000011880).
Modulen Somatic Variant (Somatisk variant)	Utför sekundär analys.	Programvaran för analysmoduler, Local Run Manager, genomför basbestämning genom sekundär analys. Bearbetningen innefattar demultiplexering, generering av FASTQ-filer, inpassning, variantbestämning och rapportering. Variantbestämningsprogrammet (Pisces) genererar VCF-filer som innehåller information om de varianter som finns på särskilda positioner i ett referensgenom, inklusive uppmätt variantfrekvens.
Modulen Germline Variant (Könsellsvariant)	Utför sekundär analys.	Programvaran för analysmoduler, Local Run Manager, genomför basbestämning genom sekundär analys. Bearbetningen innefattar demultiplexering, generering av FASTQ-filer, inpassning, variantbestämning och rapportering. Variantbestämningsprogrammet (Pisces) genererar VCF-filer som innehåller information om de varianter som finns på särskilda positioner i ett referensgenom och identifierar varje variant som heterozygot eller homozygot.

Förvaring och hantering

Element	Specifikation
Temperatur	Transport och förvaring: -10 °C till 40 °C (14 °F till 104 °F) Driftförhållanden: 19 °C till 25 °C (66 °F till 77 °F)
Luftfuktighet	Transport och förvaring: Icke-kondenserande luftfuktighet Driftförhållanden: 30–75 % relativ luftfuktighet (icke-kondenserande)

Nödvändig utrustning och material – tillhandahålls inte

Förbrukningsmaterial för sekvensering

MiSeqDx reagenskit v3 (katalognr 20012552/20037124)

Förbrukningsmaterial som tillhandahålls av användaren

Se till att följande förbrukningsmaterial finns tillgängliga innan en körning startas.

Förbrukningsmaterial	Användningsområde
Alkoholservetter, 70 % isopropyl eller etanol, 70 %	Rengöra flödescellsglaset och -steget
Servett för laboratoriebruk, luddfri	Rengöra flödescellssteget
Linspapper, 4 x 6 in	Rengöra flödescellen
Tween 20	Tvätta instrumentet
Pincett av plast, fyrkantig spets (valfri)	Avlägsna flödescellen från dess transportlåda
Vatten av laboratriekvalitet	Tvätta instrumentet

Riktlinjer för vatten av laboratoriekvalitet

Använd alltid vatten av laboratoriekvalitet för att utföra instrumentprocedurer. Använd aldrig kranvatten.

Följande är exempel på godtagbara alternativ:

- Illumina PW1
- Vattenkvalitet 18 megaohm (MΩ)
- Milli-Q-vatten
- Super-Q-vatten
- Vatten av molekylärbiologisk kvalitet

Varningar och försiktighetsåtgärder

FÖRSIKTIGHET!

Enligt federal lag i USA får denna produkt endast säljas av eller på ordination av läkare eller övrig vårdpersonal som har licens i den delstat där han/hon är verksam och får använda eller ordinera användning av produkten.

- 1 **Vissa komponenter i reagenser som tillhandahålls av Illumina för användning med MiSeqDx-instrumentet innehåller potentiellt farliga kemikalier. Personskador kan uppstå vid inandning, intagande, hudkontakt och ögonkontakt. Använd skyddsutrustning, inklusive ögonskydd, handskar och en laboratorierock som lämpar sig för den här graden av exponering. Hantera använda reagenser som kemiskt avfall och kassera dem i enlighet med nationella och lokala bestämmelser.** Information om miljö, hälsa och säkerhet finns i säkerhetsdatabladet (SDS) på support.illumina.com/sds.html.
- 2 Hantera alla blodprover som om de konstaterats bära på humant immunbristvirus (HIV), humant hepatit B-virus (HBV) och annan blodburen smitta (allmänna försiktighetsåtgärder).
- 3 Om procedurerna inte följs enligt givna anvisningar kan det leda till felaktiga resultat eller avsevärt försämrad provkvalitet.
- 4 Arbeta enligt vedertagna laboratorierutiner. Använd inte pipetten med munnen. Undvik att äta, dricka och röka i arbetsområdena. Använd engångshandskar och laboratorierockar vid hantering av prover och reagenser i kit. Tvätta händerna noga efter hantering av prover och reagenser i kittet.
- 5 God laboratoriesed och laboratoriehigien krävs för att förhindra att PCR-produkter kontaminerar reagenser, instrument och prover med genomiskt DNA. PCR-kontamination kan ge upphov till felaktiga och otillförlitliga resultat.
- 6 För att undvika kontamination ska områdena som används före och efter amplifiering ha egen utrustning och eget förbrukningsmaterial (t.ex. pipetter, pipettspetsar, värmeblock, vortexblandare och centrifuger).
- 7 Länkning av index och prov måste matcha den tryckta plattlayouten exakt. Local Run Manager fyller automatiskt i de indexprimrar som förknippas med provnamnen när de anges i modulen. Användaren rekommenderas att verifiera indexprimrarna associerade med proverna innan sekvenseringskörningen påbörjas. Bristande överensstämmelse mellan proverna och plattlayout leder till förlust av positiv providentifikation och felaktigt rapportering av resultat.
- 8 Installation av antivirusprogram som användaren själv tillhandahåller rekommenderas starkt för att skydda datorn mot virus. Se användarhandboken för anvisningar om installation.
- 9 Använd inte MiSeqDx om någon av panelerna är borttagna. Om instrumentet används när en eller flera paneler är borttagna finns det risk för potentiell exponering för systemspänning och likspänning.
- 10 Rör inte vid flödescellssteget i flödescellsfacket. Värmaren i det här facket har en temperatur mellan 22 °C och 95 °C och kan orsaka brännskador.
- 11 Instrumentet väger cirka 126 lbs och kan orsaka allvarliga personskador om det tappas eller hanteras fel.

Bruksanvisning

Följande användaranvisningar för MiSeqDx-instrumentet kräver reagenser som tillhandahålls i MiSeqDx reagenskit v3.

Skapa en körning med Local Run Manager

Detaljerade anvisningar finns i *Referensguide för Local Run Manager-programvaran för MiSeqDx (dokumentnr 100000011880)* och Local Run Manager-modulguiden för den analysmodul som du använder.

- 1 Välj **Create Run** (Skapa körning) och välj modulen Somatic Variant (Somatisk variant) eller Germline Variant (Könscellsvariant) i Local Run Manager.
- 2 Ange ett namn på körningen som identifierar körningen från sekvensering till analys.
- 3 Använd alfanumeriska tecken, blanksteg, understreck eller bindestreck.
- 4 [Valfritt] Ange en beskrivning av körningen som hjälper till att identifiera körningen. Använd alfanumeriska tecken, blanksteg, understreck eller bindestreck.

Importerera manifestfiler för körningen

- 1 Kontrollera att de manifest som du vill importera finns på en åtkomlig plats i nätverket som instrumentet är anslutet till eller på en USB-enhet.
- 2 Välj **Import Manifests** (Importerera manifest).
- 3 Navigera till manifestfilen och välj de manifest som du vill lägga till.

Ange prover för körningen


Ange prover för körningen med följande alternativ:

Enter samples manually (Ange prover manuellt) – Använd den tomma tabellen på skärmen Create Run (Skapa körning).

Import samples (Importerera prover) – Navigera till en extern fil. En mall kan hämtas på skärmen Create Run (Skapa körning).

När provtabellen fyllts i kan provinformation exporteras till en extern fil och filen kan importeras för en annan körning eller användas som referens vid beredning av bibliotek.

Ange prover manuellt

- 1 Välj antal prover och indexset i listrutan.
- 2 Ange ett unikt provnamn (*analysmodulen Germline Variant [Könscellsvariant]*) eller prov-ID (*analysmodulen Somatic Variant [Somatisk variant]*). Använd alfanumeriska tecken, bindestreck eller understreck. När modulen Somatic Variant (Somatisk variant) används kommer ett provnamn som anges i en provbrunn automatiskt att fyllas i för motsvarande brunn i den andra uppsättningen.
- 3 [Valfritt] Högerklicka och välj kontrolltyp för positiva eller negativa kontrollprover. När modulen Somatic Variant (Somatisk variant) och en kontrolluppsättning används i en provbrunn kommer samma kontroll automatiskt att överföras till motsvarande brunn i den andra uppsättningen.
- 4 [Valfritt] Välj fliken Description (Beskrivning) och ange en provbeskrivning. Använd alfanumeriska tecken, bindestreck eller understreck. När modulen Somatic Variant (Somatisk variant) används kommer en beskrivning som anges för en provbrunn automatiskt att fyllas i motsvarande brunn i den andra uppsättningen.
- 5 Välj fliken **Index 1 (i7)** och välj en Index 1-adapter i listrutan.
- 6 Välj fliken **Index 2 (i5)** och välj en Index 2-adapter i listrutan.
- 7 Välj en manifestfil i listrutan Manifest. När det gäller modulen Somatic Variant (Somatisk variant) måste proverna i uppsättning A ha ett annat manifest än proverna i uppsättning B.
- 8 Välj ett alternativ för att visa, skriva ut eller spara plattlayouten som referens för beredning av bibliotek:
 - Klicka på ikonen  **Print** (Skriv ut) för att visa plattlayouten. Välj **Print** (Skriv ut) för att skriva ut plattlayouten.
 - Klicka på **Export** (Exportera) för att exportera provinformation till en extern fil.
- 9 Välj **Save Run** (Spara körning).

Importerera prover

- 1 Klicka på **Import Samples** (Importerera prover) och bläddra till platsen där filen med provinformation finns. Två typer av filer kan importeras.
 - Klicka på **Template** (Mall) på skärmen Create Run (Skapa körning) för att skapa en ny plattlayout. Mallfilen innehåller rätt kolumnrubriker för import. Ange provinformation i varje kolumn för proverna i körningen. Ta bort exempelinformation i oanvända celler och spara sedan filen.
 - Använd en fil med provinformation som exporterats från analysmodulen med exportfunktionen.
- 2 Klicka på ikonen **Print** (Skriv ut) för att visa plattlayouten.
- 3 Välj **Print** (Skriv ut) för att skriva ut plattlayouten som referens vid förberedelse av bibliotek.
- 4 Välj **Save Run** (Spara körning).

Förbereda reagenskassetten

I följande instruktioner beskrivs hur du tinar reagenser med ett vattenbad i rumstemperatur.

- 1 Hämta reagenskassetten från platsen där den har förvarats i -15 °C till -25 °C .
- 2 Placera reagenskassetten i ett vattenbad som innehåller tillräckligt med rumstempererat avjoniserat vatten för att täcka reagenskassetten från dess botten till vattenlinjen som är tryckt på den. Låt inte vattnet gå över linjen som markerar den högsta punkten för vatten.

Bild 1 Vattenlinje



- 3 Låt reagenskassetten tina i det rumstempererade vattenbadet i ungefär 60–90 minuter eller tills den är helt tinad.
- 4 Avlägsna kassetten från vattenbadet och knacka den försiktigt mot bänken för att frigöra vatten från kassetterns botten. Torka kassetterns botten. Kontrollera att det inte har skvätt upp vatten på toppen av reagenskassetten.

Inspektera reagenskassetten

- 1 Vänd på reagenskassetten tio gånger för att blanda de upptinade reagenserna och kontrollera sedan att alla positioner är tinade.

OBS!
Det är viktigt att reagenserna i kassetten tinas ordentligt och blandas för att säkerställa korrekt sekvensering.
- 2 Kontrollera reagenserna i positionerna 1, 2 och 4 för att se till att de är helt blandade och fria från fällningar.
- 3 Knacka försiktigt kassetten i bänken för att minska mängden luftbubblor i reagenserna.

OBS!
MiSeqDx-sugrören går ner till botten av varje behållare för att suga upp reagensen, så det är viktigt att behållarna är fria från luftbubblor.
- 4 Placera reagenskassetten på is eller förvara den vid 2 °C till 8 °C (i upp till 6 timmar) tills körningen ska konfigureras. För bästa resultat ska du direkt gå vidare till att ladda provet och förbereda körningen.

Förbereda prover för sekvensering

Anvisningar för beredning av provbibliotek för sekvensering, inklusive spädning och poolning av bibliotek, finns i bruksanvisningens avsnitt i bipacksedeln till biblioteksberedning.

Spädningen av provbiblioteken baseras på oligonukleotiduppsättningarnas komplexitet. Optimering av klustertäthet på MiSeqDx krävs och optimal klustertäthet varierar beroende på den specifika biblioteksberedningsanalysen.

Ladda biblioteksprov på kassetten

När reagenskassetten är helt tinad och redo att användas ska du ladda prover i kassetten.

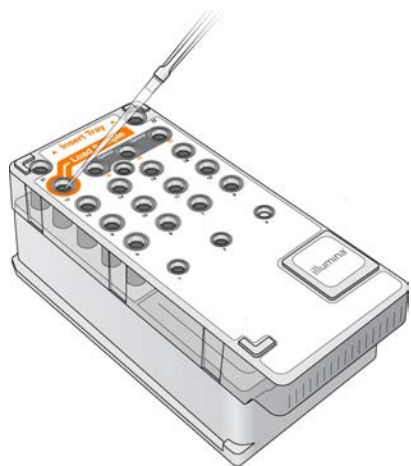
- 1 Använd en separat, ren och tom 1 ml-pipettspets för att göra hål i folieförseglingen på behållaren på reagenskassetten som är märkt med **Load Samples** (Ladda prover).

OBS!

Gör inte hål på reagensbehållare i andra positioner. Det kommer att göras hål automatiskt i de andra reagensbehållarna under körningen.

- 2 Pipettera 600 µl av **DAL**-provbibliotek i behållaren **Load Samples** (Ladda prover). Undvik att röra vid folieförseglingen.
- 3 Kontrollera om det förekommer luftbubblor i behållaren efter det att provet har laddats. Om det förekommer luftbubblor ska du försiktigt knacka kassetten mot bänken för att frigöra bubblorna.

Bild 2 Ladda bibliotek



- 4 Gå direkt vidare till körningssteget med hjälp av gränssnittet för MiSeq-systemprogramvaran (MOS).

Körningskonfiguration

Fullständiga anvisningar för hur du ställer in en sekvenseringskörning finns i *Referenshandbok för MiSeqDx-instrument med MOS v2 (dokumentnr 100000021961)*.

- 1 Logga in i MiSeqDx med ditt lösenord till programvaran Local Run Manager.
- 2 Välj **Sequence** (Sekvensera) på startskärmen i programvaran MOS.
- 3 Välj en körning ur listan och välj sedan **Next** (Nästa).
En serie skärmar för inställning av en sekvenseringskörning öppnas i följande ordning: Load Flow Cell (Ladda flödescell), Load Reagents (Ladda reagenser), Review (Granska) och Pre-run Check (Kontroll före körning).
- 4 Gör rent och ladda sedan flödescellen när skärmen Load Flow Cell (Ladda flödescell) visas.
- 5 Stäng flödescellens hake och lucka till flödescellslocket.
Både haken och lockets lucka måste vara stängda innan körningen påbörjas. När flödescellen laddas läser och registrerar programvaran RFID-etiketten. En bekräftelse på att RFID-etiketten har lästs av visas i det nedre högra hörnet på skärmen.
- 6 Följ uppmaningarna från programvaran för att ladda flaskan med MiSeqDx SBS-lösning (PR2).
Kontrollera sedan att avfallsflaskan är tom och ladda reagenskassetten.
När flaskan med MiSeqDx SBS-lösning (PR2) och flödescellen har laddats läser och registrerar programvaran RFID-etiketten. En bekräftelse på att RFID-etiketten har lästs av visas i det nedre högra hörnet på skärmen.
- 7 Skärmen Sequencing (Sekvensering) öppnas när körningen påbörjas. Skärmen ger en visuell framställning av den pågående körningen, inklusive intensiteter och kvalitetspoäng (Q-resultat).

Resultat

Programvaran för realtidsanalys (RTA) är en integrerad programvara som utför bildanalys och basbestämning samt tilldelar varje bas för varje sekvenseringscykel en kvalitetspoäng. När den primära analysen har slutförts påbörjar modulen på MiSeqDx-instrumentet som valts i *Skapa en körning med Local Run Manager* på sidan 6 den sekundära analysen, som beskrivs här.

Demultiplexering

Vid demultiplexering jämförs varje indexavläsningssekvens med de indexsekvenser som har angetts för körningen. Inga kvalitetsvärden beaktas i det här steget.

Indexavläsningar identifieras med följande steg:

- Proverna numreras i den ordning som de anges för körningen, med början på 1.
- Provnummer 0 är reserverat för kluster som inte tilldelats till något prov.
- Klustren tilldelas till ett prov när indexsekvensen matchar exakt eller när det finns högst en enskild felparning per indexavläsning.

Generering av FASTQ-filer

Efter demultiplexeringen genererar programvaran intermediära analysfiler i FASTQ-format, vilket är ett textformat som används för att representera sekvenser. FASTQ-filer innehåller avläsningar för varje prov och tillhörande kvalitetspoäng. Alla kontroller som används för körningen och kluster som inte passerat filtret utesluts.

Varje FASTQ-fil innehåller endast avläsningar för ett prov och namnet på det provet ingår i FASTQ-filens namn. I arbetsflödet Somatic Variant (Somatisk variant) genereras fyra FASTQ-filer per prov (två per oligonukleotiduppsättning), två från Read 1 (Avläsning 1) och två från Read 2 (Avläsning 2). FASTQ-filer är inpassningsstegets primära indata.

Inpassning

Under inpassningssteget passar Smith-Waterman-bandalgoritmen in kluster från varje prov mot amplikonsekvenser som specificerats i manifestfilen.

Smith-Waterman-bandalgoritmen utför semiglobal sekvensinpassning för att fastställa liknande regioner mellan två sekvenser. Smith-Waterman-algoritmen jämför inte hela sekvensen utan jämför i stället segment av alla möjliga längder.

Varje paired end-avläsning utvärderas med avseende på dess inpassning till de relevanta sondsekvenserna för avläsningen.

- Read 1 (Avläsning 1) utvärderas mot det omvända komplementet hos nedströms lokusspecifika oligonukleotider (DLSO).
- Avläsning 2 utvärderas mot uppströms locusspecifika oligonukleotider (ULSO).
- Om början på en avläsning matchar en sondsekvens med högst tre skillnader (felparningar eller förskjutningar på grund av indels) passas hela avläsningens längd in mot amplikonmålet för den sekvensen.
- Indels inom DLSO och ULSO observeras inte på grund av analysmetoden.

Inpassningsresultaten skrivs i inpassningsfiler (BAM-filer). Avläsningar filtreras från inpassningsresultat baserat på felparningsfrekvensen över antingen intresseregionen eller den fullständiga amplikonen, beroende på amplikonens längd. Filtrerade avläsningar anges som ej inpassade i inpassningsfiler och används inte vid variantbestämning.

Variantbestämning

Variantbestämningsprogrammet (Pisces) är utformat för att variantbestämma SNV:er, MNV:er och indels från bibliotek som beretts för instrumentet.

Rapporter och andra utdatafiler

Analysmodulerna för varianter genererar rapporter i PDF-format och tabbavgränsat format (*.txt), som visar mätvärden som exempelvis sekvenseringsdjup och variantantal. Modulerna genererar också utdatafiler som exempelvis VCF- och gVCF-filer (Variant Call Format).

Kvalitetskontrollprocedurer

MiSeqDx-programvaran bedömer varje körning, prov och basbestämning mot särskilda kvalitetsmått. Även positiva och negativa kontroller som används när bibliotek förbereds bör utvärderas. Utvärdera sekvenseringskontrollresultaten för kontrollerna enligt följande:

- Om en reagenskontroll utan mall genererar en bestämningsfrekvens > 10 % kan det ha inträffat ett fel i provspårningen, en inkorrekt registrering av indexprimrar eller så förekommer det en förorening i reagenskontrollen utan mall. Protokollet anses ha misslyckats och hela protokollet måste upprepas från och med biblioteksprepareringen.
- Det positiva kontrollprovet måste generera det förväntade resultatet. Om den positiva kontrollen genererar ett resultat som skiljer sig från det förväntade kan det ha inträffat ett fel i provspårningen eller en inkorrekt registrering av indexprimrar. Hela protokollet måste upprepas från och med biblioteksprepareringen.

Prestandaegenskaper

I könsellsstudierna användes antingen MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay eller TruSeq Custom Amplicon Kit Dx-reagenser för bibliotekspreparering. De två kätten använder identiska biblioteksprepareringsreagenser och det finns endast en skillnad mellan deras arbetsflöden: antalet polymeraskedjereaktionscykler (PCR) (25 respektive 28). Det ökade antalet PCR-cykler ger en lägre DNA-inmatning med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (50 ng) jämfört med MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay (250 ng), vilket visar sig i DNA-inmatningsstudien som använder TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Bibliotek som preparerades med MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay sekvenserades med de sekvenseringsreagenser som följde med i kittet. Bibliotek som preparerades med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx sekvenserades med MiSeqDx reagenskit v3. De senare sekvenseringsreagenserna ger en större mängd utdata jämfört med dem i MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay.

Vid somatiska studier användes TruSeq Custom Amplicon Kit Dx med MiSeqDx reagenskit v3.

Alla studier utfördes på MiSeqDx. Antingen användes könsellsarbetsflödet eller det somatiska arbetsflödet för TruSeq Custom Amplicon Kit Dx för att preparera bibliotek för sekvensering. Sedan utfördes analys med modulen Germline Variant (Könsellsvariant) eller modulen Somatic Variant (Somatisk variant), med två undantag. Studier där engens- (könsellsprestanda, MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay) eller tvågenspaneler (somatisk prestanda) användes som representativa mutationspaneler använde analys-specifika arbetsflöden och analysmoduler.

Obs! Amplikonens genomiska innehåll sammanfattas i förhållande till den genomiska strängen som sekvenseras. För amplikoner som har utformats mot minussträngen är referensgenominnehållet det omvända komplementet (till exempel motsvarar PolyA-regioner på minussträngamplikoner PolyT-regioner på referensgenomet).

Definitioner av beräkningar som används för prestandaegenskaper

- 1 Positiv procentuell överensstämmelse (PPA) beräknas som andelen loci som klassificeras som varianter med hjälp av en referensmetod som rapporteras korrekt i analysen.
 - $(\text{antalet variantloci som rapporteras korrekt i analysen}) / (\text{totalt antal variantloci})$
Variantloci som rapporteras i analysen och som är samstämmiga med referensmetoden är sant positiva resultat (TP). Variantloci som rapporteras som referensbestämningar eller som andra variantbestämningar i analysen är falskt negativa resultat (FN).
- 2 Negativ procentuell överensstämmelse (NPA, negative percent agreement) beräknas som andelen loci som klassificeras som vildtyp med hjälp av en referensmetod som rapporteras korrekt i analysen.
 - $(\text{antalet vildtypsloci som rapporteras korrekt i analysen}) / (\text{totalt antal vildtypsloci})$

Vildtypsloci som rapporteras i analysen och som är samstämmiga med referensmetoden är sant negativa resultat (NP). Vildtypsloci som rapporteras som varianter i analysen är falskt positiva resultat (FP).

- 3 Total procentuell överensstämmelse (OPA) beräknas som andelen loci som rapporteras korrekt i analysen i förhållande till en referensmetod.
 - $\frac{((\text{antalet variantloci som rapporteras korrekt i analysen}) + (\text{antalet vildtypsloci som rapporteras korrekt i analysen}))}{((\text{totalt antal variantloci}) + (\text{totalt antal vildtypsloci}))}$
- 4 Beräkningarna av PPA, NPA och OPA innefattar inte saknade bestämningar (variant- eller referensloci som inte uppfyller kriterierna i ett eller flera kvalitetsfilter). Två undersökningar innefattar uttryckligen saknade bestämningar i måttet ”% korrekta bestämningar” och denna inkludering av saknade bestämningar antecknas för aktuella tabeller.
- 5 Bestämningsfrekvensen beräknas som totalt antal loci som passerar filtren, delat med totalt antal positioner som sekvenserats för kromosomerna 1–22. Kromosom X och Y ingår inte. Det här värdet tar inte hänsyn till bestämningarnas överensstämmelse med referensmetoden.

Läs bipacksedeln för tillämplig metod för bibliotekspreparering och prestandaegenskaper relaterade till preanalytiska faktorer (t.ex. extraktionsmetoder eller DNA-inmatning).

Provindexering

Provindexprimrar, tillsatta under biblioteksprepareringen, tilldelar varje DNA-prov en unik sekvens, så att flera prover kan sammanföras i en sekvenseringskörning. Provindexering används för arbetsflödena i både Germline (Könszell) och Somatic (Somatisk).

Totalt testades 96 provindex med en representativ analys utformad för att undersöka olika gener som täcker 12 588 baser per sträng i alla 23 humana kromosomer i avsikt att verifiera analysens förmåga att konsekvent genotypbestämma ett givet prov med olika indexprimerkombinationer. Y-kromosomen innehåller inte säkra regioner och utvärderades inte. Åtta unika prover testades med 12 olika indexprimerkombinationer per prov. Provresultat från analysmodulen för könsceller jämfördes med Platinum Genome-versionen 2016-01. PPA (SNV och indels) översteg 97 % (sant positiva bestämningar var minst 70 för SNV, 38 för insertioner, 36 för deletioner) och NPA var 100 % (minst 23 440 referenspositioner per indexkombination) för var och en av de 96 indexkombinationerna. Oberoende testades ett enda index för att verifiera att sekvenseringskemin i MiSeqDx reagenskit v3 kan hantera färre än åtta prover (den föregående kemin i MiSeqDx universalkit 1.0 var begränsad till minst åtta prover). Indexet hade PPA-värden på 98,9 % (180/182) för SNV, 100 % (38/38) för insertioner och 100 % (46/46) för deletioner. NPA var 100 % (23,856/23,856).

Tolv replikat (24 bibliotek) av ett prov testades för att mäta indexnoggrannheten med somatiska varianter vid frekvenser från 0,05–0,10 med modulen Somatic Variant (Somatisk variant) (två indexkombinationer per replikat används för somatiska bestämningar). PPA var 100 % för SNVs (64/64), insertioner (11/11) och deletioner (19/19). NPA var 100 % (minst 11 590 referenspositioner per indexkombination) för alla indexkombinationer.

Provöverföring

MiSeqDx-instrumentets arbetsflöde omfattar biblioteksberedning och sekvensering av flera prover, plus kontroller som alla bearbetas samtidigt. Studien av överföring mellan prover utfördes för att utvärdera om falskt positiva resultat, som orsakats av kontaminering genom överföring från brunn till brunn under biblioteksberedning eller kontaminering mellan på varandra följande sekvenseringskörningar, kunde påverka testresultaten. Somatiska varianter användes eftersom de kan detekteras vid lägre allelfrekvenser än könscellsvarianterna.

Proverna bestod av fyra genomiska DNA-prover från cellinjer, där var och en innehöll olika panelmutationer i en representativ tvågensanalys. Proverna var sådana att en mutation på en position i ett prov hade en referenssekvens (vildtyp) i de andra.

Överföring mellan brunnar definieras som ett fel som eventuellt uppstått på grund av manuella bearbetningssteg (pipettering, förväxlade prover och så vidare). För att utvärdera överföring från en provbrunn till en annan utfördes två testkörningar:

- Ett schackrutigt mönster för ett genomiskt DNA-prov (gDNA) med hög inmatning som innehöll en mutation i Gen 1, alternerat med ett gDNA-prov med låg inmatning som innehöll en mutation i Gen 2.

- Ett schackrutigt mönster för ett gDNA-prov med hög inmatning som innehöll en mutation i Gen 2, alternerat med ett gDNA-prov med låg inmatning som innehöll en mutation i Gen 1.

Vid varje körning uppvisade totalt tolv replikat falskt positiva resultat (t.ex. att en Gen 1-mutation rapporterades i en brunn som angetts som prov med Gen 2-mutation eller vice versa).

Överföring mellan körningar definieras som ett fel, som eventuellt uppstått på grund av rester från en tidigare sekvenseringskörning. För att avgöra om det förekommer överföring mellan sekvenseringskörningar förbereddes två plattor som innehöll elva replikat av ett enda unikt prov av gDNA med hög inmatning vardera samt ett blankprov som därefter sekvenserades i ett MiSeqDx-instrument och kontrollerades med avseende på falskt positiva resultat. Första körningen innehöll elva replikat av ett prov med en Gen 2-mutant plus ett tomt prov. Andra körningen innehöll elva replikat av ett prov med en Gen 1-mutant och ett tomt prov. Provbiblioteket med Gen 2-mutanten sekvenserades först och följdes av en sekvenseringskörning av provbiblioteket med Gen 1-mutanten, följt av ännu en upprepade sekvenseringskörning av provbiblioteket med Gen 2-mutanten. Om några Gen 2-mutationer observeras i en körning med enbart Gen 1-mutationer, och vice versa, indikerar det överföring mellan körningarna.

Inga falskt positiva resultat (0/24, 0 %) på grund av överföring *från brunn till brunn* rapporterades. Alla förväntade mutationer upptäcktes. Inga falskt positiva resultat (0/24, 0 %) på grund av överföring *från körning till körning* rapporterades. Alla förväntade mutationer upptäcktes. Inga falskt positiva resultat (0/48, 0 %) på grund av *sammanlagd* överföring (från brunn till brunn och från körning till körning) rapporterades.

Prestandaegenskaper för könsceller

I de studier som beskrivs här användes modulen Germline Variant (Könscellsvariant) för att analysera sekvenseringsdata, förutom i de studier där en genpanel med en analyspecifik modul användes.

Noggrannhet

Följande studie utfördes för att bedöma MiSeqDx-instrumentets noggrannhet med MiSeqDx reagenskit v3 och högkvalitativt DNA. I studien användes en representativ analys utformad för att undersöka olika gener som täcker 12 588 baser i 23 olika kromosomer, med 150 amplikoner. Y-kromosomen innehåller inte säkra regioner och utvärderades inte. De 12 unika proverna som används i den här studien är från en familj – två föräldrar och tio barn – som har sekvenserats ofta av olika laboratorier och med olika sekvenseringsmetoder. Det finns fem prover från kvinnor och sju från män. Var och en av proverna testades i duplikat. Noggrannheten bestämdes för SNV:er, insertioner och deletioner genom att jämföra studiedata med en omfattande referensdatabas.

Referensdatabassekvensen (Platinum Genomes version 2016-01) härleddes från kombinationen av flera sekvenseringsmetoder, offentligt tillgängliga data och information om ärftliga egenskaper. Säkra genomregioner definierades utifrån den här referensmetoden om inget annat anges. Totalt kördes proverna åtta gånger. Tabellerna som används för att visa noggrannhetsresultaten baseras på data från den första körningen.

Tabell 1 innehåller studiedata som visas med positiv respektive negativ procentuell överensstämmelse, per prov, där varianternas resultat jämförs med den väldefinierade och sammansatta referensmetoden för beräkning av PPA. De tre varianttyperna (SNV:er, insertioner och deletioner) kombineras. Eftersom referensmetoden endast ger resultat för de enskilda nukleotidvarianterna och insertionerna/deletionerna jämförs basbestämningar utan varianter med den humana referensgenomsekvensen hg19 för beräkning av NPA.

Tabell 1 Överensstämmelse av basbestämningresultat från MiSeqDx-instrumentet per prov

Prov	Genomsn. best.frekv.	Totalt antal varianter	Totalt antal TP-varianter	Totalt antal FN-varianter	Totalt antal saknade best.	Totalt antal TN-best.	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
NA12880	> 99,9	222	220	0	6	24 052	100	100	100
NA12881	> 99,9	250	247	1	2	23 862	99,6	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	200	196	2	2	23 962	99,0	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	226	224	0	6	23 870	100	100	100
NA12884	> 99,9	228	226	1	1	23 942	99,6	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	244	240	2	2	23 942	99,2	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	230	228	1	1	23 888	99,6	100	> 99,9
NA12888	> 99,9	216	216	0	4	24 002	100	100	100
NA12893	> 99,9	236	234	0	2	23 810	100	100	100

Den representativa analysen bestod av 150 amplikoner utformade för att täcka ett brett spektrum av genomiskt innehåll. Amplikonernas GC-innehåll varierade inom 26–87 %. Amplikonerna hade även en rad olika enkelnukleotid- (t.ex. PolyA, PolyT), dinukleotid- och trinukleotidupprepningar. Data sammanställdes per amplikon (Tabell 2) för att fastställa det genomiska innehållets effekt på procentandelen korrekta bestämningar. Procentandelen korrekta bestämningar utgörs av variant- och referensbestämningar och är lägre än 100 % om det förekommer antingen felaktiga eller saknade bestämningar. Inga bestämningar inträffar när ett eller flera filter inte uppfylls för variantbestämning (t.ex. otillräcklig täckning).

Av de åtta FN-varianterna från Tabell 2 inträffade sju med en insertion på 1 bp på amplikon 111, som också innehåller PolyA-homopolymer och GC-innehåll på 0,29. Återstående 1 FN (felaktig bestämning) berodde på en förväntad heterozygot SNV på amplikon 125 med ett GC-innehåll på 0,68, bestämd som en homozygot variant. SNV-variantfrekvensen var 0,71, vilket är över 0,70-tröskeln för klassificering som en homozygot variant. Amplikonen med de lägsta procentuella korrekta bestämningarna (98,2 %) var amplikon 17 med 40 saknade bestämningar, som innehöll AT-upprepningar och GC-innehåll på 27 %.

Tabell 2 Noggrannhet på amplikonnivå för MiSeqDx-instrumentet

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensregioner	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Totalt antal korrekta best.	Totalt antal felaktiga best.	Totalt antal saknade best.	% korrekta best.
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	2 232	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1 896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	2 184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	2 208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1 944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1 680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	2 112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	2 160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1 920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Ej tillämpligt	0,65	1 944	0	0	100

11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1 800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	2 112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	2 088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	2 184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Ej tillämpligt	0,43	2 232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1 752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	2 192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Ej tillämpligt	0,43	1 992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1 680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	2 112	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1 774	0	2	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1 872	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	2 328	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Ej tillämpligt	0,29	1 872	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	1 488	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1 656	0	0	100

27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	1 488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Ej tillämpligt	0,78	1 800	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA (3)	0,62	2 016	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	Ej tillämpligt	0,39	1 536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1 992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1 608	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	2 184	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1 800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	2 448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	2 208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	2 244	0	12	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	2 352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	2 280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	2 064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	2 256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	2 184	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Ej tillämpligt	0,44	1 752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	2 112	0	0	100

45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	2 088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	2 040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	2 160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	2 184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Ej tillämpligt	0,31	1 584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	2 232	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Ej tillämpligt	0,42	1 992	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	2 113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1 608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	2 352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	1 560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Ej tillämpligt	0,49	2 304	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1 992	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	2 328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1 872	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	2 184	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1 896	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	2 160	0	0	100

63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	2 280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	2 102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Ej tillämpligt	0,49	1 920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Ej tillämpligt	0,51	1 944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Ej tillämpligt	0,45	2 304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1 680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Ej tillämpligt	0,65	2 400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	1 488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Ej tillämpligt	0,59	2 448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1 752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Ej tillämpligt	0,42	2 040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	2 184	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	2 040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	0,34	2 040	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	2 040	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	2 016	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	2 232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Ej tillämpligt	0,49	1 944	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1 704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	2 280	0	0	100

83	13	24167504	24167576	73	73	Ej tillämpligt	0,52	1 752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	2 112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	2 136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1 848	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	1 608	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Ej tillämpligt	0,25	1 992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1 727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1 944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	2 184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	1 584	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	2 256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	2 304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1 632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	2 232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	2 280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1 704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Ej tillämpligt	0,36	2 184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1 680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Ej tillämpligt	0,27	1 512	0	0	100

102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	2 280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	2 088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	2 496	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	2 184	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	2 136	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	2 088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	2 184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	2 232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	2 136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1 944	7	17	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	2 184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT(4), AT (4), indel	0,26	2 208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1 887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	2 064	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	2 016	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1 608	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Ej tillämpligt	0,37	2 184	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	1 656	0	0	100

120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1 800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1 944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	2 040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Ej tillämpligt	0,48	1 560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Ej tillämpligt	0,59	2 376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Ej tillämpligt	0,68	1 775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	Ej tillämpligt	0,64	1 680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Ej tillämpligt	0,61	2 256	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1 968	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1 824	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	1 680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	2 424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1 608	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	2 112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	2 088	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	1 584	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	2 352	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	2 088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	1 656	0	0	100

139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	2 160	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	2 400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Ej tillämpligt	0,68	2 328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	2 328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Ej tillämpligt	0,6	2 376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	2 208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1 656	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1 656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Ej tillämpligt	0,52	1 704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Ej tillämpligt	0,55	0	0	0	Ej tillämpligt
149	Y	2655519	2655609	91	0	Ej tillämpligt	0,48	0	0	0	Ej tillämpligt
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	Ej tillämpligt

Varianter som saknade bestämmingar sammanfattas i Tabell 3. De specifika filtren som resulterade i saknade bestämmingar listas i tabellen. Insertionen på amplicon 111 filtrerades för 9 av 16 förekomster med de återstående sju förekomsterna som referens och är därför FN.

Tabell 3 Sammanfattning av saknade variantbestämningar

Amplikonnr	Krom.:pos.	Variant	Motsvarande ampliconinnehåll	Filter	Saknade varianter	Förväntade varianter	FN-best.
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: upprepningsfilter. En variant filtreras om hela eller en del av varianten upprepas i referensgenomet som angränsar till variantens position. Minst nio upprepningar i referensen krävs och endast upprepningar med en längd på upp till 5 bp beaktas.

Resultaten från sekvenseringen av prov NA12878 jämfördes med en mycket säker genotyp för NA12878 som etablerats av National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Av de 150 ampliconerna låg 92 helt inom i de mycket säkra genomområdena, 41 överlappade delvis och 17 ampliconer överlappade inte alls NIST-sekvensen. Det gav 10 000 koordinater per replikat att jämföra. Basbestämningar utan varianter jämfördes med den humana referensgenomsekvensen 19. Resultaten med avseende på noggrannhet visas i Tabell 4.

Tabell 4 Överensstämmelse av basbestämningresultat från MiSeqDx-instrumentet för ett NA12878-prov med NIST-databasen

Prov	Antal ampliconer	Genomsn. best.frekv.	Totalt antal TP-varianter	Totalt antal FN-varianter	Totalt antal TN-best.	Totalt antal FP-best.	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19 380	0	100	100	100

Proverna analyserades vidare för bestämning av små insertioner and deletioner (indels) (Tabell 5). I vissa fall var indelen vanlig för två eller flera prover, vilket visas i kolumnen "Totalt antal provreplikat med indel". Resultaten för båda replikaten av de tolv giltiga proverna visas i Tabell 5. Det fanns totalt 71 indels i storlekarna 1–24 bp för insertioner och 1–25 bp för deletioner. 69 indels detekterades med en positiv procentuell överensstämmelse på 100 %. En deletion (amplikon 64; 2 bp-deletion (chr10 55892600 TAC>T) hade inga korrekta bestämningar eftersom var och en av varianterna var en saknad bestämning på grund av R5x9-filtret5) och därför kunde inte PPA, som inte omfattar några bestämningar, beräknas. En annan indel, 1 bp-insertion (chr17 39589692 C>CA) på amplikon 111, hade heller inga korrekta bestämningar eftersom nio varianter var en saknad bestämning på grund av R5x9-filtret och sju var FN-bestämningar.

Tabell 5 Sammanfattning av indeldetektering med MiSeqDx-instrumentet

Amplikon	Kromosom	Position	Analyserad fragmentstorlek	Indeltyp och längd för amplikon	Indel	Totalt antal provreplikat med indel	Antal saknade best.	Totalt antal felaktiga indelbest.	Totalt antal korrekta indelbest.	PPA
1	1	36450544	93	25 bp, deletion	GAAAATTTAA-TGAAACACA-TTGCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	3 bp, deletion	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	23 bp, insertion	T>TTTTAAT-AGCAAAAA-GAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	17 bp, deletion	GACAGACTGT-GAGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	5 bp, insertion	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	3 bp, insertion	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	90	7 bp, insertion	T>TTTGGTAA	14	0	0	14	100
9	2	87003972	80	6 bp, deletion	TTATCTC>T	6	0	0	6	100

13	2	200796749	87	5 bp, insertion	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	12 bp, insertion	C>CTGAAA- ATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	2 bp, insertion	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	23 bp, deletion	TAACTTAAA- ATTACAAAA- TAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	9 bp, insertion	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	1 bp, deletion	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	66	8 bp, deletion	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	11 bp, insertion	T>TTATGG- TATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	4 bp, deletion	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	8 bp, insertion	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	21 bp, deletion	CCCTGGGTGCTA- TAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	3 bp, deletion	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32986905	95	25 bp, deletion	CTTTCACITTC- CCGICTCATG- CAAAG>C	12	0	0	12	100

41	6	41647442	95	23 bp, deletion	GGCATGAGG- CTTGGTGAC- ATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	1 bp, insertion	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	4 bp, deletion	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	1 bp, insertion	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	4 bp, deletion	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156476548	93	11 bp, deletion	GAATCTG- CACTT>G	12	0	0	12	100
52	8	24811064	90	1 bp, deletion	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	4 bp, insertion	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	4 bp, insertion	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	21 bp, deletion	TCTGGGGG- GCAGCCCC- TGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	3 bp, deletion	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	16 bp, deletion	AGCGTCTAT- AACC AAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55892600	89	2 bp, deletion	TAC>T	10	10	0	0	Ej tillämpligt

68	11	30177690	70	2 bp, insertion	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59837721	62	8 bp, insertion	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100
75	11	118406328	85	8 bp, deletion	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	2 bp, deletion	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	21 bp, insertion	T>TTCTCAG- TACGGTGA- ACCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	19 bp, insertion	C>CAAAAATA- TAAAAAGC- TCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	4 bp, insertion	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	20 bp, deletion	ATCTATTT- TCTAATAG- ACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	22 bp, deletion	TTTAAAATTT- GAATGTGA- TAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58050081	81	4 bp, insertion	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	16 bp, deletion	CTTGCTCTAT- AAACCGT>C	10	0	0	10	100
93	14	102808554	94	5 bp, deletion	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	6 bp, deletion	CAAAATT>C	12	0	0	12	100

96	15	77879862	95	25 bp, deletion	GCCCCTGAG- CCAGCCTCC- CGCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	3 bp, insertion	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	4 bp, insertion	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	7 bp, deletion	ATTATTT>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	1 bp, deletion	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	18 bp, insertion	A>ATCCTAT- TCTACTCT- GAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	4 bp, insertion	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	1 bp, insertion	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	84	24 bp, insertion	T>TTCTGAAG- GTCAAGTCT- ATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	4 bp, deletion	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	79	12 bp, deletion	TTTGTAT- CTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38837054	75	22 bp, insertion	T>TGTATCT- TAGCAAAA- GTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	3 bp, insertion	T>TGAG	20	0	0	20	100

122	18	54815706	85	2 bp, deletion	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	70	15 bp, deletion	TACTTGAGA- ACTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	101	5 bp, insertion	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50897361	67	11 bp, insertion	G>GGAATG- TCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	16 bp, deletion	TCCTGGCTG- GCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	11 bp, insertion	G>GATAAA- ACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	21 bp, deletion	ACTCAAGA- TAACTCAT- GTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	5 bp, deletion	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	100	6 bp, insertion	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	5 bp, insertion	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	10 bp, deletion	GGGCAC- AGGCA>G	12	0	0	12	100

Reproducerbarhet

Två studier utfördes för att bedöma MiSeqDx-instrumentets noggrannhet med cellinjer (studie 1 och 2) eller leukocytarmat blod med cellinjer (studie 2). Studie 1 använde flera instrument och studie 2 utfördes på flera olika platser.

Studie 1

MiSeqDx-instrumentets reproducerbarhet bestämdes med hjälp av två instrument, två operatörer, två reagenspartier och totalt åtta körningar. Den representativa analysen, proverna och referensmetoden är desamma som för noggrannhetsstudien.

Resultaten presenteras för varje applikon och varje instrument (Tabell 6) för att visa bestämningarnas reproducerbarhet för instrumenten. Procentandelen korrekta bestämningar inkluderade både felaktiga och saknade bestämningar (ett eller flera filter uppfylls inte för variantbestämning). Instrumenten genererade liknande antal saknade bestämningar och felaktiga bestämningar för specifika applikationer.

Tabell 6 Studie av reproducerbarheten av resultaten från MiSeqDx-instrumentet på olika instrument (amplikonnivå)

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensregioner	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Totalt antal korrekta best.	Totalt antal felaktiga best.	Totalt antal saknade best.	Totalt antal korrekta best.	Totalt antal felaktiga best.	Totalt antal saknade best.
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	8 928	0	0	8 928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	7 584	0	0	7 584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	8 736	0	0	8 736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	8 832	0	0	8 832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	7 776	0	0	7 776	0	0
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	6 720	0	0	6 720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	8 448	0	0	8 448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	8 640	0	0	8 640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	7 680	0	0	7 680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	Ej tillämpligt	0,65	7 775	1	0	7 775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	7 200	0	0	7 200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	8 448	0	0	8 448	0	0
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	8 352	0	0	8 352	0	0

14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	8 736	0	0	8 736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	Ej tillämpligt	0,43	8 928	0	0	8 928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	7 008	0	0	7 008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	8 761	0	167	8 760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	Ej tillämpligt	0,43	7 968	0	0	7 968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	6 720	0	0	6 720	0	0
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	8 448	0	0	8 448	0	0
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	7 096	0	8	7 096	0	8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	7 488	0	0	7 488	0	0
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	9 312	0	0	9 312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	Ej tillämpligt	0,29	7 488	0	0	7 488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	5 952	0	0	5 952	0	0
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	6 624	0	0	6 624	0	0
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	5 952	0	0	5 952	0	0

28	5	1882081	1882158	78	75	Ej tillämpligt	0,78	7 200	0	0	7 200	0	0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	8 064	0	0	8 064	0	0
30	5	41069808	41069871	64	64	Ej tillämpligt	0,39	6 144	0	0	6 144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	7 968	0	0	7 968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	6 432	0	0	6 432	0	0
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG (3)	0,55	8 736	0	0	8 736	0	0
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	7 200	0	0	7 200	0	0
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	9 792	0	0	9 792	0	0
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	8 832	0	0	8 832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	8 979	0	45	8 979	0	45
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	9 408	0	0	9 408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	9 120	0	0	9 120	0	0
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	8 256	0	0	8 256	0	0
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	9 024	0	0	9 024	0	0
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	8 736	0	0	8 736	0	0
43	7	22202076	22202148	73	73	Ej tillämpligt	0,44	7 008	0	0	7 008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	8 448	0	0	8 448	0	0

45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	8 352	0	0	8 352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	8 160	0	0	8 160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	8 550	0	90	8 550	0	90
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	8 736	0	0	8 736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	Ej tillämpligt	0,31	6 336	0	0	6 336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	8 928	0	0	8 928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	Ej tillämpligt	0,42	7 968	0	0	7 968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	8 452	0	92	8 449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	6 432	0	0	6 432	0	0
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	9 408	0	0	9 408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	6 240	0	0	6 240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	Ej tillämpligt	0,49	9 216	0	0	9 216	0	0
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	7 968	0	0	7 968	0	0
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	9 312	0	0	9 312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	7 488	0	0	7 488	0	0
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	8 644	1	91	8 644	1	91

61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	7 584	0	0	7 584	0	0
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	8 640	0	0	8 640	0	0
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	9 120	0	0	9 120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	8 408	0	40	8 407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	Ej tillämpligt	0,49	7 680	0	0	7 680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	Ej tillämpligt	0,51	7 776	0	0	7 776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	Ej tillämpligt	0,45	9 216	0	0	9 216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	6 720	0	0	6 720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	Ej tillämpligt	0,65	9 600	0	0	9 600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	5 952	0	0	5 952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	Ej tillämpligt	0,59	9 792	0	0	9 792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	7 008	0	0	7 008	0	0
73	11	101347052	101347136	85	85	Ej tillämpligt	0,42	8 160	0	0	8 160	0	0
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	8 736	0	0	8 736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	8 160	0	0	8 160	0	0
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	0,34	8 160	0	0	8 160	0	0
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	8 160	0	0	8 160	0	0

78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	8 064	0	0	8 064	0	0
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	8 928	0	0	8 928	0	0
80	12	30881766	30881846	81	81	Ej tillämpligt	0,49	7 776	0	0	7 776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	6 816	0	0	6 816	0	0
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	9 117	3	0	9 119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	Ej tillämpligt	0,52	7 008	0	0	7 008	0	0
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	8 448	0	0	8 448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	8 544	0	0	8 544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	7 392	0	0	7 392	0	0
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA (3)	0,39	6 432	0	0	6 432	0	0
88	14	39517884	39517966	83	83	Ej tillämpligt	0,25	7 968	0	0	7 968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	6 830	0	82	6 835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	7 776	0	0	7 776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	8 736	0	0	8 736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	6 336	0	0	6 336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	9 024	0	0	9 024	0	0
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	9 216	0	0	9 216	0	0

95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	6 528	0	0	6 528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	8 928	0	0	8 926	2	0
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	9 120	0	0	9 120	0	0
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	6 816	0	0	6 816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	Ej tillämpligt	0,36	8 736	0	0	8 736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	6 720	0	0	6 720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	Ej tillämpligt	0,27	6 048	0	0	6 048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	9 120	0	0	9 120	0	0
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	8 352	0	0	8 352	0	0
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	9 984	0	0	9 984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	PolyT (5), indel	0,37	8 736	0	0	8 736	0	0
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	8 544	0	0	8 544	0	0
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	8 347	0	5	8 347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	8 736	0	0	8 736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	8 928	0	0	8 928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	8 544	0	0	8 544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	7 776	7	89	7 777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	8 736	0	0	8 736	0	0

113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT (4), AT(4), indel	0,26	8 832	0	0	8 832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	7 546	0	38	7 547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	8 256	0	0	8 256	0	0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	8 064	0	0	8 064	0	0
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	6 432	0	0	6 432	0	0
118	18	6980478	6980568	91	91	Ej tillämpligt	0,37	8 736	0	0	8 736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	6 624	0	0	6 624	0	0
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	7 200	0	0	7 200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	7 776	0	0	7 776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	8 160	0	0	8 160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	Ej tillämpligt	0,48	6 240	0	0	6 240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	Ej tillämpligt	0,59	9 504	0	0	9 504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	Ej tillämpligt	0,68	7 102	2	0	7 104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	Ej tillämpligt	0,64	6 718	2	0	6 718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	Ej tillämpligt	0,61	9 024	0	0	9 024	0	0

128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	7 872	0	0	7 872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	7 296	0	0	7 296	0	0
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG (4), indel	0,46	6 720	0	0	6 720	0	0
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	9 696	0	0	9 696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	6 432	0	0	6 432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	8 360	0	88	8 360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	8 352	0	0	8 352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	6 336	0	0	6 336	0	0
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	9 408	0	0	9 408	0	0
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	8 352	0	0	8 352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	6 603	0	21	6 601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	8 640	0	0	8 640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	9 600	0	0	9 600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	Ej tillämpligt	0,68	9 312	0	0	9 312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	9 312	0	0	9 312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	Ej tillämpligt	0,6	9 504	0	0	9 504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	8 832	0	0	8 832	0	0
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	6 624	0	0	6 624	0	0

146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	6 624	0	0	6 624	0	0
147	X	135290777	135290847	71	71	Ej tillämpligt	0,52	6 816	0	0	6 816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	Ej tillämpligt	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2655519	2655609	91	0	Ej tillämpligt	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Resultaten från reproducerbarhetsstudien analyserades för de olika operatörerna med variantfrekvensen (Tabell 7). Den här analysen visade att variantfrekvenser var konsekventa för olika operatörer. Genomsnittliga variantfrekvenser +/- 1 standardavvikelse visas.

Tabell 7 Resultat för olika operatörer för MiSeqDx-instrumentet

Variantfrekvensområde	Antal unika varianter	Totalt antal varianter analyserade av operatör 1	Totalt antal varianter analyserade av operatör 2	Genomsnittlig (SD) rapporterad variantfrekvens för operatör 1	Genomsnittlig (SD) rapporterad variantfrekvens för operatör 2
Homozygot (0,70–1,00)	2 424	2 424	2 422	0,94 +/- 0,07	0,96 +/- 0,05
Heterozygot (0,20–0,70)	8 240	8 132	8 128	0,48 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

Sammanlagda resultat för reproducerbarhetsstudier för varje prov från alla åtta körningar visas (Tabell 8). Detektering utvärderas för varje varianttyp separat – SNV:er, insertioner och deletioner. Referenspositioner ingår inte. Analysen visade att resultaten för varianterna var reproducerbara med alla proverna.

Tabell 8 Överensstämmelse av basbestämningsresultat från MiSeqDx-instrumentet per prov

Prov	SNV:er				Insertioner				Deletioner			
	Totalt antal	Totalt antal TP	Totalt antal FP	Totalt antal FN	Totalt antal	Totalt antal TP	Totalt antal FP	Totalt antal FN	Totalt antal	Totalt antal TP	Totalt antal FP	Totalt antal FN
NA1287 7	592	592	0	0	336	336	0	0	288	288	0	0
NA1287 8	1 456	1 456	0	0	320	304	0	0	384	368	0	0
NA1287 9	912	912	0	0	336	320	0	2	288	288	0	0
NA1288 0	1 072	1 071	0	1	384	384	0	0	320	304	0	0
NA1288 1	1 248	1 247	0	1	384	368	0	0	368	368	0	0
NA1288 2	944	943	0	1	352	336	0	4	304	288	0	0
NA1288 3	1 088	1 087	0	1	368	368	0	0	352	335	0	1
NA1288 4	1 088	1 088	0	0	400	384	0	5	336	336	0	0
NA1288 5	1 200	1 189	0	7	400	382	0	4	352	336	0	0
NA1288 6	1 104	1 102	0	2	368	352	0	3	368	368	0	0
NA1288 8	1 056	1 054	0	2	368	368	0	0	304	304	0	0
NA1289 3	1 168	1 168	0	0	352	336	0	1	368	368	0	0

Data från de åtta körningarna i denna reproducerbarhetsstudie stöder påståendet att MiSeqDx-instrumentet konsekvent kan sekvensera följande:

- GC-innehåll ≥ 19 % (alla bestämda baser i 192 av 192 sekvenserade amplikoner med 19 % GC-innehåll bestämdes korrekt med 1,1 % saknade bestämningar)
- GC-innehåll ≤ 78 % (alla bestämda baser i 192 av 192 sekvenserade amplikoner med 78 % GC-innehåll bestämdes korrekt utan saknade bestämningar)
- PolyA-längder ≤ 8 (PolyA-upprepning med 8 nukleotider bestämdes korrekt för 192 av 192 sekvenserade amplikoner med PolyA = 8)
- PolyT-längder ≤ 10 (PolyT-upprepning med 10 nukleotider bestämdes korrekt för 192 av 192 sekvenserade amplikoner med PolyT = 10)
- PolyG-längder ≤ 7 (PolyG-upprepning med 7 nukleotider bestämdes korrekt för 192 av 192 sekvenserade amplikoner med PolyG = 7)
- PolyC-längder ≤ 6 (PolyC-upprepning med 6 nukleotider bestämdes korrekt för 576 av 576 sekvenserade amplikoner med PolyC = 6)
- Dinukleotidupprepningslängder $\leq 11x$ (alla bestämda baser i 192 av 192 sekvenserade amplikoner med en 11x dinukleotidupprepning bestämdes korrekt med 0,5 % saknade bestämningar)
- Trinukleotidupprepningslängder $\leq 5x$ (alla bestämda baser i 192 av 192 sekvenserade amplikoner med en 5x trinukleotidupprepning bestämdes korrekt med 0,5 % saknade bestämningar)
- 24 eller färre basinsertioner och 25 eller färre basdeletioner
 - 24-basinsertioner bestämdes korrekt för 192 av 192 prover
 - 25-basdeletioner bestämdes korrekt för 223 prover och bestämdes felaktigt för 1 av 224 prover

Studie 2

En reproducerbarhetsstudie för olika platser som utfördes med en representativ analys, MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay, inkluderade en underuppsättning av kliniskt signifikanta genetiska variationer av *CFTR* analyserade med MiSeq-rapportprogramvaran och ett riktat MiSeqDx-DNA-sekvenseringsarbetsflöde (Tabell 9). För den blinda studien användes tre testplatser och två operatörer på varje plats. Två väl kartlagda paneler med 46 prover vardera testades av var och en av operatörerna på varje plats, vilket resulterade i totalt 810 bestämningar per plats. Panelerna innehöll en blandning av genomiskt DNA från cellinjer med kända varianter i *CFTR*-genen, samt leukocyturmat blod berikat med cellinjer med kända varianter i *CFTR*-genen. Blodproverna tillhandahölls för att göra det möjligt att använda extraktionsstegen som användes för att preparera gDNA som fungerar som primära indata för analysens arbetsflöde. Godkännandefrekvensen för proverna, definierad som antalet prover som får godkända QC-mått vid första försöket, var 99,88 %. Alla testresultat baseras på de första testerna.

Tabell 9 Sammanfattning av reproducerbarhetsstudieresultat utförda med en representativ MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

Panel	Provrnr	Provets genotyp	Varianter	Totalt antal bestämningar per plats	Positiva bestämningar (varianter)			Negativa bestämningar (vildtyp)			Antal felaktiga best.	Antal saknade best.	Positiv överensstämmelse (%)	Negativ överensstämmelse (%)	Total överensstämmelse (%)
					Plats 1	Plats 2	Plats 3	Plats 1	Plats 2	Plats 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

Panel	Provnr	Provets genotyp	Varianter	Totalt antal bestämmningar per plats	Positiva bestämmningar (varianter)			Negativa bestämmningar (vildtyp)			Antal felaktiga best.	Antal saknade best.	Positiv överensstämmelse (%)	Negativ överensstämmelse (%)	Total överensstämmelse (%)
					Plats 1	Plats 2	Plats 3	Plats 1	Plats 2	Plats 3					
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

Panel	Provnr	Provets genotyp	Varianter	Totalt antal bestämmingar per plats	Positiva bestämmingar (varianter)			Negativa bestämmingar (vildtyp)			Antal felaktiga best.	Antal saknade best.	Positiv överensstämmelse (%)	Negativ överensstämmelse (%)	Total överensstämmelse (%)
					Plats 1	Plats 2	Plats 3	Plats 1	Plats 2	Plats 3					
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C förekommer inte	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

Panel	Provnr	Provets genotyp	Varianter	Totalt antal bestämmingar per plats	Positiva bestämmingar (varianter)			Negativa bestämmingar (vildtyp)			Antal felaktiga best.	Antal saknade best.	Positiv överensstämmelse (%)	Negativ överensstämmelse (%)	Total överensstämmelse (%)
					Plats 1	Plats 2	Plats 3	Plats 1	Plats 2	Plats 3					
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	Ej tillämpligt	100	100

Panel	Provnr	Provets genotyp	Varianter	Totalt antal bestämmingar per plats	Positiva bestämmingar (varianter)			Negativa bestämmingar (vildtyp)			Antal felaktiga best.	Antal saknade best.	Positiv överensstämmelse (%)	Negativ överensstämmelse (%)	Total överensstämmelse (%)
					Plats 1	Plats 2	Plats 3	Plats 1	Plats 2	Plats 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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Provnr	Provets genotyp	Varianter	Totalt antal bestämmingar per plats	Positiva bestämmingar (varianter)			Negativa bestämmingar (vildtyp)			Antal felaktiga best.	Antal saknade best.	Positiv överensstämmelse (%)	Negativ överensstämmelse (%)	Total överensstämmelse (%)
					Plats 1	Plats 2	Plats 3	Plats 1	Plats 2	Plats 3					
A	40	621+1G>T/ 3120+ 1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/ 3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/ F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/ 621+ 1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/ F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/ R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+ 5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Provnr	Provets genotyp	Varianter	Totalt antal bestämningar per plats	Positiva bestämningar (varianter)			Negativa bestämningar (vildtyp)			Antal felaktiga best.	Antal saknade best.	Positiv överensstämmelse (%)	Negativ överensstämmelse (%)	Total överensstämmelse (%)
					Plats 1	Plats 2	Plats 3	Plats 1	Plats 2	Plats 3					
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	Ej tillämpligt	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	394deITT (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	Ej tillämpligt	100	100

Panel	Provnr	Provets genotyp	Varianter	Totalt antal bestämmningar per plats	Positiva bestämmningar (varianter)			Negativa bestämmningar (vildtyp)			Antal felaktiga best.	Antal saknade best.	Positiv överensstämmelse (%)	Negativ överensstämmelse (%)	Total överensstämmelse (%)
					Plats 1	Plats 2	Plats 3	Plats 1	Plats 2	Plats 3					
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Provnr	Provets genotyp	Varianter	Totalt antal bestämningar per plats	Positiva bestämningar (varianter)			Negativa bestämningar (vildtyp)			Antal felaktiga best.	Antal saknade best.	Positiv överensstämmelse (%)	Negativ överensstämmelse (%)	Total överensstämmelse (%)
					Plats 1	Plats 2	Plats 3	Plats 1	Plats 2	Plats 3					
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	Ej tillämpligt	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

Panel	Provnr	Provets genotyp	Varianter	Totalt antal bestämningar per plats	Positiva bestämningar (varianter)			Negativa bestämningar (vildtyp)			Antal felaktiga best.	Antal saknade best.	Positiv överensstämmelse (%)	Negativ överensstämmelse (%)	Total överensstämmelse (%)
					Plats 1	Plats 2	Plats 3	Plats 1	Plats 2	Plats 3					
B	77	621+ 1G>T/ A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Ej tillämpligt	100	100
B	80	F508del/ R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/ G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/ F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/ F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Provnr	Provets genotyp	Varianter	Totalt antal bestämmingar per plats	Positiva bestämmingar (varianter)			Negativa bestämmingar (vildtyp)			Antal felaktiga best.	Antal saknade best.	Positiv överensstämmelse (%)	Negativ överensstämmelse (%)	Total överensstämmelse (%)
					Plats 1	Plats 2	Plats 3	Plats 1	Plats 2	Plats 3					
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	Ej tillämpligt	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	394delITT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Totalt				74 556	2 209			221 182			4	273	99,77	99,88	99,88

¹Vildtypspositioner som motsvarar N1303K-varianten för ett replikat resulterade i en saknad bestämning på grund av otillräcklig täckning.

² Ett replikat i proverna 5 och 75 hade en bestämningsfrekvens på 0 %. En vidare undersökning indikerar att prover kanske inte hade lagts till i provplattan före biblioteksprepareringen eftersom provvolymerna som återstod i rören överensstämde med att ingen volym hade tagits bort.

³ Bevis tyder på att operatören sannolikt bytte plats på proverna 9 och 10 före biblioteksprepareringen.

⁴ Vildtypspositioner som motsvarar M1V-varianten för ett replikat av vart och ett av två prover resulterade i en saknad bestämning på grund av otillräcklig täckning.

Prestandaegenskaper för Somatic (Somatisk)

Studierna som beskrivs här använde modulen Somatic Variant (Somatisk variant) för att analysera sekvenseringsdata, förutom de studier som använde två genpaneler med en analyspecifik modul.

Noggrannhet

Tre studier genomfördes för att bedöma det DNA som MiSeqDx-instrumentet extraherade från FFPE-prover.

Studie 1

I studien användes en representativ analys utformad för att undersöka olika gener som täcker 12 588 baser i 23 olika kromosomer, med 150 amplikoner. Y-kromosomen innehåller inte säkra regioner och utvärderades inte. De fem unika proverna som används i den här studien är från en familj – två föräldrar och tre barn – som har sekvenserats ofta av olika laboratorier och med olika sekvenseringsmetoder. Det finns tre prover från kvinnor och två från män. Alla prover formalinfixerades och bäddades in i paraffin innan DNA extraherades för studien. Prov GM12877 späddes ut med prov GM12878 på DNA-nivå för att skapa GM12877-D och en uppsättning varianter med frekvenser nära 5 % och 10 %. Vart och ett av proverna testades i duplikat, förutom GM12877-D som testades med fem replikat. Noggrannheten bestämdes för SNV:er, insertioner och deletioner genom att jämföra studiedata med en omfattande referensdatabas. Referensdatabassekvensen (Platinum Genomes version 2016-01) härleddes från kombinationen av flera sekvenseringsmetoder, offentligt tillgängliga data och information om ärftliga egenskaper. Säkra genomregioner definierades utifrån den här referensmetoden om inget annat anges. Totalt kördes proverna åtta gånger. Tabellerna som används för att visa noggrannhetsresultaten baseras på data från den första körningen.

Tabell 10 innehåller studiedata som visas med positiv respektive negativ procentuell överensstämmelse, per prov, där varianternas resultat jämförs med den väldefinierade och sammansatta referensmetoden för beräkning av PPA. De tre varianttyperna (SNV:er, insertioner och deletioner) kombineras. Eftersom referensmetoden endast ger resultat för de enskilda nukleotidvarianterna och insertionerna/deletionerna jämförs basbestämningar utan varianter med den humana referensgenomsekvensen hg19 för beräkning av NPA.

Tabell 10 Överensstämmelse av basbestämningsresultat från MiSeqDx-instrumentet med referensdata för sex väl kartlagda prover

Prov	Genomsn. best.frekv.	Totalt antal varianter	Totalt antal TP-varianter	Totalt antal FN-varianter	Totalt antal TN-best.	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	152	147	0	23 719	100	100	100
GM12878	98,4	270	260	0	23 482	100	100	100
GM12879	98,7	192	186	0	23 744	100	100	100
GM12885	99,1	244	236	0	23 713	100	100	100
GM12886	98,7	230	226	0	23 652	100	100	100
GM12877-D ¹	98,4	675	650	0	57 608	100	100	100
GM12877-D ²		155	155	0		100	100	100

¹ Varianter med en frekvens som är större än 20 %.

² Varianter med en frekvens som är mindre än 20 %.

De 150 ampliconerna utformades för att täcka ett brett spektrum av genomiskt innehåll. Ampliconernas GC-innehåll varierade inom 26–87 %. Ampliconerna hade även en rad olika enkelnukleotid- (t.ex. PolyA, PolyT), dinukleotid- och trinukleotidupprepningar. Sex unika prover användes i analysen. Data sammanställdes per amplicon (Tabell 11) för att fastställa det genomiska innehållets effekt på procentandelen korrekta bestämningar. Procentandelen korrekta bestämningar utgörs av variant- och referensbestämningar och är lägre än 100 % om det förekommer antingen felaktiga eller saknade bestämningar. Inga bestämningar inträffar när ett eller flera filter inte uppfylls för variantbestämning (t.ex. otillräcklig täckning). Det fanns inga felaktiga bestämningar. Antalet saknade bestämningar varierade kraftigt för ampliconerna. GC-innehåll och flera interaktioner med GC-innehåll var de viktigaste variablerna för saknade bestämningar. 2 040/2 580 (79 %) av de saknade bestämningarna berodde på att täckningsspecifikationen inte uppfylldes. Ampliconer med GC-innehåll över 78 % resulterade i flest saknade bestämningar. En representativ amplicon med 78 % GC hade totalt 675 saknade bestämningar. En representativ amplicon med 87 % hade totalt 1 365 saknade bestämningar. Täckningen kan ökas genom att minska antalet prover som laddas på flödescellen, vilket kan möjliggöra detektering på ampliconer med högt GC-innehåll.

Tabell 11 Noggrannhetsdata på ampliconnivå

Amplicon	Kromosom	Ampliconens start	Ampliconens slut	Analyserad fragmentsstorlek	Baser i konfidsregioner	Ampliconens genomiska innehåll	GC-innehåll	Totalt antal korrekta best.	Totalt antal felaktiga best.	Totalt antal saknade best.	% korrekta best.
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	1 395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1 185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	1 364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	1 380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1 215	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1 050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	1 320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	1 350	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1 200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Ej tillämpligt	0,65	1 215	0	0	100

11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1 117	0	10	99,1
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	1 320	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	1 302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	1 365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Ej tillämpligt	0,43	1 395	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1 095	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	1 349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	Ej tillämpligt	0,43	1 245	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1 050	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	1 305	0	30	97,8
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1 108	0	2	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1 170	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	1 455	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Ej tillämpligt	0,29	1 169	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	1 035	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	Ej tillämpligt	0,78	450	0	675	40,0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	1 260	0	0	100

30	5	41069808	41069871	64	64	Ej tillämpligt	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1 245	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1 005	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	1 365	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1 125	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	1 530	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	1 380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	1 383	0	27	98,1
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	1 455	0	15	99,0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	1 425	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	1 290	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	1 410	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	1 365	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Ej tillämpligt	0,44	1 095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	1 320	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	1 299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	1 275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	1 350	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	1 365	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Ej tillämpligt	0,31	990	0	0	100

50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	1 395	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Ej tillämpligt	0,42	1 245	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	1 305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1 005	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	1 470	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	Ej tillämpligt	0,49	1 440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1 242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	1 455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1 170	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	0	0	1 365	0
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1 185	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	1 350	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	1 425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	1 290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	Ej tillämpligt	0,49	1 200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Ej tillämpligt	0,51	1 215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Ej tillämpligt	0,45	1 440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1 050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Ej tillämpligt	0,65	1 500	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	930	0	0	100

71	11	64418856	64418957	102	102	Ej tillämpligt	0,59	1 530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1 095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Ej tillämpligt	0,42	1 275	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	1 365	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	1 275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	0,34	1 275	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	1 275	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	1 260	0	14	98,9
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	1 395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Ej tillämpligt	0,49	1 215	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1 065	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	1 425	0	0	100
83	12	24167504	24167576	73	73	Ej tillämpligt	0,52	1 095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	1 305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	1 335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1 155	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	1 005	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Ej tillämpligt	0,25	1 245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1 038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1 215	0	0	100

91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	1 365	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	1 410	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	1 440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1 020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	1 395	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	1 425	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1 065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Ej tillämpligt	0,36	1 365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1 050	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Ej tillämpligt	0,27	945	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	1 425	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	1 305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	1 560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	1 362	0	3	99,8
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	1 335	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	1 303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	1 365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	1 395	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	1 335	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1 215	0	78	94,0

112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	1 365	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT(4), AT (4), indel	0,26	1 365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1 175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	1 289	0	1	99,9
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	1 260	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1 005	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Ej tillämpligt	0,37	1 365	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1 035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1 121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1 215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	1 275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Ej tillämpligt	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Ej tillämpligt	0,59	1 478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	Ej tillämpligt	0,68	1 110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Ej tillämpligt	0,64	1 050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Ej tillämpligt	0,61	1 410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1 230	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1 140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	1 050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	1 515	0	0	100

132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1 005	0	6	99,4
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	1 320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	1 305	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	1 470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	1 305	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	1 029	0	7	99,3
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	1 350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	1 500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	Ej tillämpligt	0,68	1 455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	1 455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Ej tillämpligt	0,6	1 485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	1 380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1 035	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1 035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Ej tillämpligt	0,52	1 065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Ej tillämpligt	0,55	0	0	0	Ej tillämpligt
149	Y	2655519	2655609	91	0	Ej tillämpligt	0,48	0	0	0	Ej tillämpligt
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	Ej tillämpligt

Varianter som saknade bestämmingar sammanfattas i Tabell 12. De specifika filtren som resulterade i saknade bestämmingar listas i tabellen.

Tabell 12 Sammanfattning av saknade variantbestämningar

Amplikonnr	Krom.:pos.	Variant	Motsvarande amplikoninnehåll	Filter	Saknade varianter	Förväntade varianter
28	5:1882129	T > G	78 % GC	LowDP ¹		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: låg täckning. En variant filtreras om djupet i minst en av uppsättningarna vid den positionen är under 900.

² R3x6: upprepningsfilter. En variant filtreras om hela eller en del av varianten upprepas i referensgenomet som angränsar till variantens position. Minst sex upprepningar i referensen krävs och endast upprepningar med en längd på upp till 3 bp beaktas.

Resultaten från sekvenseringen av proverna jämfördes med en mycket säker genotyp för NA12878 som etablerats av National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Av de 150 amplikonerna låg 92 helt inom i de mycket säkra genomregionerna, 41 överlappade delvis och 17 amplikoner överlappade inte alls NIST-sekvensen. Det gav 10 000 koordinater per replikat att jämföra. Basbestämningar utan varianter jämfördes med den humana referensgenomsekvensen hg19. Resultaten med avseende på noggrannhet visas i tabell 13.

Tabell 13 Överensstämmelse av basbestämningresultat från MiSeqDx-instrumentet med NIST-referens för GM12878-prov

Prov	Antal amplikoner	Genomsn. best.frekv.	Totalt antal TP-variantbest.	Totalt antal FN-variantbest.	Totalt antal TN-best.	Totalt antal FP-best.	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19 231	0	100	100	100

De fem ej utspädda proverna analyserades vidare för bestämning av små insertioner and deletioner (indels) (Tabell 14). I vissa fall var indelen vanlig för två eller flera prover, vilket visas i kolumnen "Totalt antal provreplikat med indel". Resultaten för båda replikaten av de fem proverna visas i Tabell 14. Det fanns totalt 71 indels som varierade i storlek från 1–24 bp för insertioner och 1–25 bp för deletioner. 68 indels detekterades vardera med en positiv procentuell överensstämmelse på 1. Tre insertioner och deletioner hade inga korrekta bestämningar eftersom var och en av varianterna var en saknad bestämning på grund av R3x6-filtret och därför kunde PPA, som inte omfattar några bestämningar, inte beräknas. De tre varianterna var 1 bp-deletion (chr8 24811064 AG>A), 2 bp-deletion (chr10 55892600 TAC>T) och 1 bp-insertion (chr17 39589692 C>CA).

Tabell 14 Sammanfattning av indeldetektering med MiSeqDx-instrumentet

Amplikon	Kromosom	Position	Analyserad fragmentstorlek	Indeltyp och längd för amplikon	Indel	Totalt antal provreplikat med indel	Antal saknade best.	Totalt antal felaktiga indelbest.	Totalt antal korrekta indelbest.	PPA
1	1	36450544	93	25 bp, deletion	GAAAATTTAA-TGAAACACAT-TGTCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	3 bp, deletion	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	23 bp, insertion	T>TTTTAATA-GCAAAAAG-AGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	17 bp, deletion	GACAGACTGT-GAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	5 bp, insertion	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	3 bp, insertion	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	7 bp, insertion	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	6 bp, deletion	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	5 bp, insertion	T>TTAAAA	15	0	0	15	100

14	2	212245090	91	12 bp, insertion	C>CTGAAA ATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	2 bp, insertion	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	23 bp, deletion	TAACTTAA- AATTACAAA- ATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	9 bp, insertion	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	1 bp, deletion	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	8 bp, deletion	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	11 bp, insertion	T>TTATGGTATGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	4 bp, deletion	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	8 bp, insertion	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	21 bp, deletion	CCCTGGGT- GCTATAGC- CCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	3 bp, deletion	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	25 bp, deletion	CTTTCACTT- TCCCGTCTCA- TGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	23 bp, deletion	GGCATGAG- GCTTGGTGA- CATGGCA>G	11	0	0	11	100

44	7	66276142	88	1 bp, insertion	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	4 bp, deletion	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	1 bp, insertion	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	4 bp, deletion	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	11 bp, deletion	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	1 bp, deletion	AG>A	15	15	0	0	Ej tillämpligt
53	8	76518677	67	4 bp, insertion	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	4 bp, insertion	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	21 bp, deletion	TCTGGGGG- GCAGCCCC- TGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	3 bp, deletion	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	16 bp, deletion	AGCGTCTAT- AACC AAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	2 bp, deletion	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	2 bp, insertion	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	8 bp, insertion	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100

75	11	118406328	85	8 bp, deletion	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	2 bp, deletion	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	21 bp, insertion	T>TTCTCAG- TACGGTG- AACCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	19 bp, insertion	C>CAAAATATAA- AAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	4 bp, insertion	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	20 bp, deletion	ATCTATTT- TCTAATAG- ACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	22 bp, deletion	TTTAAAATT- TGAATGTG- ATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	4 bp, insertion	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	16 bp, deletion	CTTGCTCTA- TAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	5 bp, deletion	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	6 bp, deletion	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	25 bp, deletion	GCCCCTGAGC- CAGCCTCCC- GCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	3 bp, insertion	C>CTTG	9	0	0	9	100

100	15	89864316	70	4 bp, insertion	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	7 bp, deletion	ATTATTC>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	1 bp, deletion	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	18 bp, insertion	A>ATCCTATTC- TACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	4 bp, insertion	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	84	1 bp, insertion	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	24 bp, insertion	T>TTCTGAA- GGTCAAGTC- TATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	4 bp, deletion	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	12 bp, deletion	TTTGTAT- CTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	22 bp, insertion	T>TGTATCTT- AGCAAAAG- TTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	3 bp, insertion	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	2 bp, deletion	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	15 bp, deletion	TACTTGAGA ACTGAGG>T	9	0	0	9	100

131	20	25278464	101	5 bp, insertion	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	11 bp, insertion	G>GGAATG- TCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	16 bp, deletion	TCCTGGCTGG- CCTGTGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30300873	66	11 bp, insertion	G>GATAAA- ACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	21 bp, deletion	ACTCAAGAT- AACTCATG- TTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	5 bp, deletion	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	6 bp, insertion	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	5 bp, insertion	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	10 bp, deletion	GGGCAC AGGCA>G	7	0	0	7	100

Studie 2

I den här studien användes kolorektala FFPE-prover från cancervävnad och en representativ tvågensanalys som jämfördes med referensmetoden – dubbelriktad sekvensering av Sanger (Sanger). Av de totalt 1 183 deltagarna hade 441 deltagare giltiga Sanger-resultat och representativa analysresultat. När de utvärderades på deltagarnivå (Tabell 15) var 230 av de 441 deltagarna positiva enligt Sanger (mutation detekterad av Sanger), och av dessa var 227 positiva enligt den representativa analysen. De återstående 211 av de 441 deltagarna var negativa enligt Sanger (ingen mutation detekterades av Sanger), och av dessa var 206 negativa enligt den representativa analysen. Det resulterade i en positiv procentuell överensstämmelse (PPA) på 98,7 % och en negativ procentuell överensstämmelse (NPA) på 97,6 % (Tabell 15).

Tabell 15 Positiv och negativ procentuell överensstämmelse för resultat på deltagarnivå

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

Prestandasammanfattning

Statistik för överensstämmelse	Punktberäkning	Exakt 95 % KI
PPA	227/230 = 98,7 %	[96,2 %, 99,7 %]
NPA	206/211 = 97,6 %	[94,6 %, 99,2 %]

¹Det fanns 224 exakta matchningar bland deltagarna, alla mutationsnivåer. För två deltagare detekterade MiSeqDx den Sanger-detekterade mutationen och ytterligare en mutation. För en deltagare upptäckte MiSeqDx och Sanger olika mutationer.

²För en deltagare detekterades två mutationer med Sanger. För två deltagare detekterades en mutation med Sanger.

Studie 3

I den här studien utvärderades DNA-bibliotek preparerade med FFPE-prover från flera vävnadstyper. Totalt 109 FFPE-prover från åtta olika vävnader (kolon, äggstock, bukspottkörtel, binjure, urinblåsa, lever, sköldkörtel och bröst) med minst 11 FFPE-prover som representerar varje vävnadstyp. Binjurvävnaden inkluderade metastaser från tumörer i mag-tarmkanalen, lunga och kolon. Den andra vävnaden hade primära tumörer. I studien användes en representativ analysdesign för att undersöka 26 gener som täcker 21 577 baser i 17 olika kromosomer. Totalt sex olika gener (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* och *BRAF*) Sanger-sekvenserades och varje tumör som hade 1–3 gener som Sanger-sekvenserades baserat på förväntad prevalens av somatiska mutationer för den tumören. Resultaten från Sanger-sekvenseringen identifierade 39 SNV-somatiska mutationer i 33 av 109 FFPE-prover. MiSeqDx identifierade 36 SNV-somatiska mutationer i 32 av 109 FFPE-prover med ett falskt negativt och två variantpositioner som saknade bestämningar. PPA var 97,3 %. MiSeqDx identifierade 78 975 referensbaser för 109 FFPE-prover med 29 falskt positiva resultat i förhållande till Sanger-sekvenseringen och 2 437 saknade bestämningar. NPA var 99,9 %. En deletion av två baser stämde överens för de två metoderna. Resultaten per vävnadstyp sammanfattas i Tabell 16.

Tabell 16 Positiv och negativ procentuell överensstämmelse enligt vävnadstyp

Vävnadstyp	Antal prover	Totalt antal varianter	Totalt antal TP-varianter	Totalt antal FN-varianter	Totalt antal TN-best.	Totalt antal FP-best.	Totalt antal saknade best.	PPA	NPA
Binjure	16	6	4	1	11 823	2	607	80	> 99,9
Urinblåsa	12	4	4	0	7 070	3	273	100	> 99,9
Bröst	16	3	3	0	13 439	7	479	100	99,9
Kolon	11	6	5	0	8 720	2	133	100	> 99,9
Lever	13	3	3	0	7 984	1	59	100	> 99,9
Äggstock	13	7	7	0	10 581	1	724	100	> 99,99
Bukspottkörtel	17	7	7	0	11 929	12	489	100	99,9
Sköldkörtel	11	3	3	0	7 429	1	652	100	> 99,9
Totalt	109	39	36	1	78 974	29	3 416	97,3	> 99,9

Reproducerbarhet

Två studier genomfördes för att bedöma MiSeqDx-instrumentets reproducerbarhet med DNA extraherat från FFPE-prover. Studie 1 använde flera instrument och studie 2 utfördes på flera olika platser.

Studie 1

MiSeqDx-instrumentets reproducerbarhet bestämdes med hjälp av två instrument, två utbildade operatörer och totalt åtta körningar. Representativ analys, amplikonens genomiska kontext, prover och referensmetod är desamma som dem som beskrivs för noggrannhetsstudie 1 ovan. Resultaten presenteras för varje amplikon och varje instrument (Tabell 17) för att visa bestämningarnas reproducerbarhet för instrumenten. Procentandelen korrekta bestämningar inkluderade både felaktiga och saknade bestämningar (ett eller flera filter uppfylls inte för variantbestämning). Instrumenten genererade liknande antal saknade bestämningar för specifika amplikoner. En enda felaktig bestämning i en säker region, som definierades enligt Platinum Genomes-referensstandard, observerades för MiSeqDx 1. Den felaktiga bestämningen var en falskt positiv bestämning av en insertionsvariant i amplikon 64 för kromosom 10 i positionerna 55892599 till 55892687 – amplikonen hade en dinukleotidupprepning på 11.

Tabell 17 Studie av reproducerbarheten av resultaten från MiSeqDx-instrumentet på olika instrument (amplikonnivå)

Amplikon	Kromosom	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidsensregioner	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	M70215			M70217		
						Totalt antal korrekta best.	Totalt antal felaktiga best.	Totalt antal saknade best.	Totalt antal korrekta best.	Totalt antal felaktiga best.	Totalt antal saknade best.
1	1	93	93	Indel	0,22	5 580	0	0	5 580	0	0
2	1	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	4 740	0	0	4 740	0	0
3	1	91	91	Indel	0,4	5 448	0	12	5 453	0	8
4	1	92	92	Indel	0,49	5 518	0	2	5 518	0	2
5	1	81	81	PolyG (5)	0,69	4 858	0	2	4 860	0	0
6	1	70	70	PolyT (10), indel	0,39	4 200	0	0	4 200	0	0
7	1	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	5 279	0	1	5 279	0	1
8	2	90	90	Indel	0,28	5 400	0	0	5 400	0	0
9	2	80	80	Indel	0,38	4 800	0	0	4 800	0	0
10	2	85	81	Ej tillämpligt	0,65	4 859	0	1	4 859	0	1
11	2	75	75	PolyA (8)	0,35	4 468	0	40	4 468	0	40
12	2	88	88	PolyT (5)	0,42	5 280	0	0	5 280	0	0
13	2	87	87	PolyT (5), indel	0,31	5 211	0	43	5 214	0	40

14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	5 453	0	7	5 449	0	11
15	2	93	93	Ej tillämpligt	0,43	5 579	0	1	5 579	0	1
16	2	73	73	PolyT (5), indel	0,42	4 378	0	2	4 379	0	1
17	3	93	93	AT(3), indel	0,27	5 396	0	184	5 396	0	184
18	3	83	83	Ej tillämpligt	0,43	4 980	0	0	4 980	0	0
19	3	70	70	CT(3), indel	0,49	4 193	0	7	4 194	0	6
20	3	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	5 220	0	120	5 220	0	120
21	3	75	74	Indel	0,57	4 432	0	8	4 432	0	8
22	4	78	78	PolyA (6)	0,26	4 676	0	4	4 676	0	4
23	4	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	5 820	0	0	5 820	0	0
24	4	78	78	Ej tillämpligt	0,29	4 679	0	1	4 677	0	3
25	4	66	62	PolyA (5), indel	0,36	3 720	0	0	3 720	0	0
26	4	71	69	PolyA (5)	0,46	4 140	0	0	4 140	0	0
27	4	62	62	PolyA (7), indel	0,27	3 676	0	45	3 671	0	51
28	5	78	75	Ej tillämpligt	0,78	3 368	0	1 132	3 485	0	1 015
29	5	84	84	GT(3), CCA (3)	0,62	5 040	0	0	5 040	0	0

30	5	64	64	Ej tillämpligt	0,39	3 840	0	0	3 840	0	0
31	5	83	83	PolyA (6), indel	0,3	4 979	0	1	4 980	0	0
32	5	67	67	PolyT (5)	0,37	4 020	0	0	4 020	0	0
33	5	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	5 460	0	0	5 460	0	0
34	5	75	75	Indel	0,43	4 498	0	6	4 500	0	1
35	6	102	102	PolyG (6)	0,68	6 120	0	0	6 120	0	0
36	6	92	92	Indel	0,63	5 520	0	0	5 520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), indel	0,61	5 532	0	108	5 532	0	108
38	6	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	5 820	0	60	5 820	0	60
39	6	95	95	Indel	0,53	5 697	0	3	5 698	0	2
40	6	86	86	PolyC (6)	0,7	5 159	0	1	5 160	0	0
41	6	95	94	PolyG (5), indel	0,61	5 638	0	2	5 638	0	2
42	6	91	91	PolyA (5)	0,44	5 460	0	0	5 460	0	0
43	7	73	73	Ej tillämpligt	0,44	4 380	0	0	4 380	0	0
44	7	88	88	Indel	0,35	5 279	0	1	5 276	0	4
45	7	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	5 184	0	36	5 181	0	39
46	7	85	85	Indel	0,38	5 100	0	0	5 100	0	0
47	7	90	90	PolyG (5), indel	0,62	5 398	0	2	5 399	0	1

48	7	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	5 460	0	0	5 459	0	1
49	7	81	66	Ej tillämpligt	0,31	3 960	0	0	3 960	0	0
50	7	93	93	Indel	0,35	5 580	0	0	5 579	0	1
51	8	83	83	Ej tillämpligt	0,42	4 980	0	0	4 980	0	0
52	8	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	5 219	0	121	5 220	0	120
53	8	67	67	Indel	0,3	4 020	0	0	4 020	0	0
54	9	98	98	PolyG (6)	0,67	5 879	0	1	5 880	0	0
55	9	65	65	Indel	0,32	3 894	0	6	3 895	0	5
56	9	96	96	Ej tillämpligt	0,49	5 760	0	0	5 760	0	0
57	9	83	83	AT(3)	0,37	4 973	0	7	4 978	0	2
58	9	97	97	PolyC (6), indel	0,68	5 817	0	3	5 818	0	2
59	10	79	78	PolyG (5), indel	0,47	4 679	0	1	4 680	0	0
60	10	98	91	GC(3)	0,87	450	0	5 010	632	0	4 828
61	10	79	79	PolyT (5)	0,3	4 740	0	0	4 740	0	0
62	10	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	5 400	0	0	5 400	0	0
63	10	95	95	Indel	0,35	5 699	0	1	5 699	0	1
64	10	89	88	AC(11), indel	0,42	5 157	0	276	5 153	2	273
65	10	80	80	Ej tillämpligt	0,49	4 800	0	0	4 800	0	0
66	10	81	81	Ej tillämpligt	0,51	4 860	0	0	4 860	0	0

67	11	97	96	Ej tillämpligt	0,45	5 760	0	0	5 760	0	0
68	11	70	70	Indel	0,46	4 199	0	2	4 200	0	1
69	11	100	100	Ej tillämpligt	0,65	5 999	0	1	5 998	0	2
70	11	62	62	Indel	0,37	3 720	0	0	3 720	0	0
71	11	102	102	Ej tillämpligt	0,59	6 120	0	0	6 118	0	2
72	11	73	73	PolyA (5)	0,4	4 380	0	0	4 380	0	0
73	11	85	85	Ej tillämpligt	0,42	5 100	0	0	5 100	0	0
74	11	91	91	PolyG (6)	0,55	5 437	0	23	5 441	0	19
75	11	85	85	Indel	0,53	5 100	0	0	5 100	0	0
76	11	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	5 100	0	0	5 100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5 100	0	0	5 100	0	0
78	12	84	84	PolyC (5), indel	0,52	5 040	0	60	5 038	0	63
79	12	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	5 577	0	3	5 573	0	7
80	12	81	81		0,49	4 860	0	0	4 860	0	0
81	12	71	71	PolyA (6)	0,35	4 260	0	0	4 260	0	0
82	12	95	95	PolyG (5)	0,68	5 605	0	95	5 605	0	95
83	13	73	73	Ej tillämpligt	0,52	4 380	0	0	4 379	0	1
84	13	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	5 220	0	60	5 220	0	60
85	13	89	89	Indel	0,49	5 340	0	0	5 340	0	0

86	13	77	77	Indel	0,39	4 620	0	0	4 620	0	0
87	14	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	4 020	0	0	4 020	0	0
88	14	83	83	Ej tillämpligt	0,25	4 980	0	0	4 980	0	0
89	14	73	72	PolyT (5), indel	0,19	4 173	0	147	4 173	0	147
90	14	81	81	Indel	0,38	4 860	0	2	4 860	0	0
91	14	91	91	Indel	0,35	5 459	0	1	5 460	0	0
92	14	66	66	PolyA (5)	0,41	3 900	0	240	3 900	0	240
93	14	94	94	Indel	0,62	5 637	0	3	5 637	0	3
94	15	98	96	PolyC (5)	0,45	5 760	0	0	5 760	0	0
95	15	68	68	Indel	0,25	4 079	0	1	4 078	0	2
96	15	95	93	PolyG (5), indel	0,68	5 475	0	105	5 487	0	93
97	15	95	95	PolyT (6)	0,43	5 699	0	1	5 700	0	0
98	15	72	71	Indel	0,65	4 260	0	0	4 260	0	0
99	15	91	91	Ej tillämpligt	0,36	5 460	0	0	5 460	0	0
100	15	70	70	Indel	0,56	4 200	0	0	4 200	0	0
101	16	63	63	Ej tillämpligt	0,27	3 780	0	0	3 780	0	0
102	16	95	95	PolyC (5)	0,67	5 700	0	0	5 700	0	0
103	16	87	87	TA(3)	0,41	5 220	0	0	5 220	0	0
104	16	104	104	PolyC (5)	0,67	6 238	0	3	6 238	0	3
105	16	91	91	PolyT (5), indel	0,37	5 443	0	17	5 444	0	16

106	17	89	89	GC(3)	0,64	5 251	0	89	5 339	0	1
107	17	87	87	PolyC (5), indel	0,67	5 212	0	8	5 212	0	8
108	17	91	91	Indel	0,46	5 459	0	1	5 459	0	1
109	17	93	93	Indel	0,26	5 580	0	0	5 580	0	0
110	17	91	89	PolyT (5)	0,54	5 340	0	0	5 340	0	0
111	17	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	4 860	0	308	4 860	0	307
112	17	91	91	PolyA (5)	0,34	5 459	0	1	5 459	0	1
113	17	92	92	PolyA (7), AT (3), AT(4), AT (4), indel	0,26	5 460	0	60	5 460	0	60
114	17	79	79	Indel	0,41	4 699	0	41	4 700	0	40
115	17	86	86	PolyT (7)	0,22	5 153	0	7	5 156	0	4
116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5 039	0	1	5 039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4 020	0	0	4 020	0	0
118	18	91	91	Ej tillämpligt	0,37	5 460	0	0	5 460	0	0
119	18	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	4 132	0	8	4 131	0	9
120	18	75	75	PolyA (5), indel	0,37	4 475	0	85	4 480	0	79
121	18	81	81	CTC(3), indel	0,47	4 860	0	0	4 860	0	0
122	18	85	85	CT(3), indel	0,45	5 098	0	2	5 098	0	2
123	18	65	65	Ej tillämpligt	0,48	3 900	0	0	3 900	0	0
124	19	99	99	Ej tillämpligt	0,59	5 926	0	14	5 924	0	16

125	19	74	74	Ej tillämpligt	0,68	4 440	0	0	4 438	0	2
126	19	70	70	Ej tillämpligt	0,64	4 199	0	1	4 200	0	0
127	20	94	94	Ej tillämpligt	0,61	5 640	0	1	5 638	0	3
128	20	82	82	AC(3)	0,59	4 920	0	0	4 920	0	0
129	20	76	76	CT(3)	0,58	4 559	0	1	4 558	0	2
130	20	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	4 200	0	0	4 200	0	0
131	20	101	101	Indel	0,63	6 060	0	0	6 060	0	0
132	20	67	67	Indel	0,36	4 020	0	31	4 020	0	25
133	20	91	88	PolyG (6)	0,73	5 277	0	3	5 274	0	6
134	20	87	87	Indel	0,57	5 218	0	2	5 218	0	2
135	21	66	66	Indel	0,35	3 959	0	1	3 957	0	3
136	21	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	5 880	0	0	5 880	0	0
137	21	87	87	GT(3), indel	0,39	5 220	0	0	5 220	0	0
138	21	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	4 119	0	31	4 113	0	37
139	21	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	5 399	0	1	5 399	0	1
140	22	100	100	Indel	0,63	5 998	0	7	5 997	0	5
141	22	97	97	Ej tillämpligt	0,68	5 819	0	1	5 819	0	1
142	22	97	97	Indel	0,46	5 818	0	2	5 816	0	4
143	22	99	99	Ej tillämpligt	0,6	5 940	0	0	5 940	0	0
144	22	92	92	Indel	0,66	5 519	0	1	5 519	0	1

145	X	69	69	PolyT (5)	0,26	4 139	0	1	4 140	0	0
146	X	69	69	PolyC (5)	0,62	4 136	0	4	4 137	0	3
147	X	71	71	Ej tillämpligt	0,52	4 260	0	0	4 260	0	0
148	Y	65	0	Ej tillämpligt	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	Ej tillämpligt	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Resultaten från reproducerbarhetsstudien analyserades för de olika operatörerna med variantfrekvensen (Tabell 18). Den här analysen visade att variantfrekvenser var konsekventa för olika operatörer. Genomsnittliga variantfrekvenser ± 1 standardavvikelse visas.

Tabell 18 Resultat för olika operatörer för MiSeqDx-instrumentet

Variant-frekvensområde	Antal unika varianter	Totalt antal varianter analyserade av operatör 1	Totalt antal varianter analyserade av operatör 2	Genomsnittlig (SD) rapporterad variantfrekvens för operatör 1	Genomsnittlig (SD) rapporterad variantfrekvens för operatör 2
Hög frekvens (~ 100 %)	1 112	1 072	1 072	0,96 \pm 0,05	0,96 \pm 0,05
Medelhög frekvens (~ 50 %)	3 240	3 151	3 161	0,49 \pm 0,04	0,49 \pm 0,04
Låg frekvens (3-7 %)	620	618	612	0,05 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01

Sammanlagda resultat för reproducerbarhetsstudier för varje prov från alla åtta körningar visas (Tabell 19). Detektering utvärderas separat för varje varianttyp – SNV:er, insertioner och deletioner. Referenspositioner ingår inte. Analysen visade att resultaten för varianterna var reproducerbara med alla proverna.

Tabell 19 Överensstämmelse av basbestämningsresultat från MiSeqDx-instrumentet per prov

Prov	SNV:er				Insertioner				Deletioner			
	Totalt antal	Totalt antal TP	Totalt antal FP	Totalt antal FN	Totalt antal	Totalt antal TP	Totalt antal FP	Totalt antal FN	Totalt antal	Totalt antal TP	Totalt antal FP	Totalt antal FN
GM12877	592	574	2	0	336	336	0	0	228	272	0	0
GM12878	1 456	1 432	0	0	320	304	0	0	384	352	0	0
GM12879	912	896	0	0	336	320	0	0	288	272	0	0
GM12885	1 200	1 192	0	0	400	384	0	0	352	320	0	0
GM12886	1 104	1 104	0	0	368	352	0	0	368	352	0	0
GM12877-D1 ¹	3 640	3 582	0	0	800	760	0	0	960	880	0	0
GM12877-D2 ²	400	398	0	0	520	516	0	0	560	556	0	0

¹ Varianter med en frekvens som är större än 20 %.

² Varianter med en frekvens som är mindre än 20 %.

Data från de åtta körningarna i denna reproducerbarhetsstudien stöder påståendet att MiSeqDx-instrumentet konsekvent kan sekvensera följande:

- GC-innehåll ≥ 19 % (alla bestämda baser i 120 av 120 sekvenserade ampliconer med 19 % GC-innehåll bestämdes korrekt med 3,4 % saknade bestämningar)
- GC-innehåll ≥ 73 % (alla bestämda baser i 120 av 120 sekvenserade ampliconer med 73 % GC-innehåll bestämdes korrekt med 0,1 % saknade bestämningar)
- PolyA-längder ≤ 8 (PolyA-upprepning med 8 nukleotider bestämdes korrekt för 120 av 120 sekvenserade ampliconer med PolyA = 8)
- PolyT-längder ≤ 10 (PolyT-upprepning med 10 nukleotider bestämdes korrekt för 120 av 120 sekvenserade ampliconer med PolyT = 10)
- PolyG-längder ≤ 6 (PolyG-upprepning med 6 nukleotider bestämdes korrekt för 720 av 720 sekvenserade ampliconer med PolyG = 6)
- PolyC-längder ≤ 6 (PolyC-upprepning med 6 nukleotider bestämdes korrekt för 359 av 360 sekvenserade ampliconer med PolyC = 6 och en saknad bestämning)
- Dinukleotidupprepningslängder $\leq 4x$ (alla bestämda baser i 600 av 600 sekvenserade ampliconer med en 4x dinukleotidupprepning bestämdes korrekt med 0,4 % saknade bestämningar)
- Trinukleotidupprepningslängder $\leq 5x$ (alla bestämda baser i 120 av 120 sekvenserade ampliconer med en 5x trinukleotidupprepning bestämdes korrekt med 1,9 % saknade bestämningar)

- 24 eller färre basinsertioner och 25 eller färre basdeletioner
 - 24-basinsertioner bestämdes korrekt för 120 av 120 prover
 - 25-basdeletioner bestämdes korrekt för 182 prover och rapporterades som saknade bestämningar för 2 av 184 prover

Studie 2

En extern studie utfördes för att bedöma reproducerbarheten av den representativa tvågenanalysen, som beskrivs i noggrannhetsstudie 2, på tre externa testplatser (två operatörer per plats), ett reagensparti och tre icke på varandra följande testdagar. Testerna utfördes med sex väl kartlagda provpaneler med genomiska DNA-prover från kliniska FFPE-prover eller cellinjer. Varje panel bestod av 10 deltagare, totalt 60 deltagare för alla paneler.

De 60 paneldeltagarna bestod av duplikat av fyra unika prover av vildtyp (för panelmutationer), tolv unika mutantprover (med en enda mutation) framställda vid både höga och låga mutationsfrekvensnivåer, och två unika mutantprover (med en enda mutation) endast framställda vid en låg mutationsfrekvensnivå. Varje unikt prov/mutationsfrekvensnivåprov (testat i duplikat i varje körning) hade 36 möjliga resultat (två replikat × två operatörer × tre dagar × tre platser) om alla resultat var giltiga.

Percent Expected Call (PEC) utvärderades för alla positiva och negativa varianter genom att jämföra det representativa analysresultatet med det förväntade mutationsresultatet (förväntad mutation detekterad eller inte detekterad) i varje prov. PEC beräknas som 100 % gånger antalet förväntade bestämningar dividerat med antalet försök. Det tvåsidiga 95 % konfidensintervallet beräknas med Wilson Score-metoden.

Genom att kombinera platser blev provhastigheten $\geq 94,7$ % för den första körningen av provet eller i prover som testades i körningar som godkändes under den första körningen. PEC för mutationsnivån för alla prover med mutationer var 99,6 % (905/909) (95 % KI; 98,9, 99,8). Antalet försök till bestämningar för alla 56 panelmutationer (oavsett om en detekterad mutation förväntades eller inte) för alla giltiga prover var 58 856 (56 × 1 051). Av de 58 856 observationerna på mutationsnivå fanns det endast sex incidenter där de observerade och förväntade resultaten inte stämde överens. PEC för mutationsnivån för alla positiva och negativa varianter från alla deltagare med mutant- och vildtypspaneler var tillsammans 99,99 % (58 850/58 856).

Analytisk sensitivitet (gräns för blankprov [LoB] och detekteringsgräns [LoD])

I den här studien verifierades analysens cutoff och detekteringsgräns (LoD) för MiSeqDx bestämdes med en representativ panel. De väl kartlagda Platinum Genome-cellinjerna GM12878 och GM12877 formalinfixerades och bäddades in i paraffin under en kort stund, följt av DNA-extraktion. GM12878 späddes ut med GM12877 så att variantfrekvenserna för sjuttio varianter (52 SNV, nio insertioner och nio deletioner) var nära 0,05. De två DNA-proverna testades av två operatörer med två instrument och två reagenspartier under totalt 10 MiSeqDx-sekvenseringskörningar. Det resulterade i 40 replikat för varje variant i GM12878 och 60 replikat för varje motsvarande vildtypskoordinat i GM12877 för vardera reagensparti. LoB och LoD beräknades med hjälp av den klassiska metoden som anges i CLSI EP17-A2, med det icke-parametriska alternativet. LoB och LoD beräknades för SNV:er, insertioner och deletioner separat genom poolning av variantfrekvenserna för en given varianttyp. Typ I-fel definierades som 0,01 och typ II-fel definierades som 0,05.

För LoB sorterades de poolade variantfrekvenserna från lägsta till högsta och den 99:e i ordningen för varje reagensparti, för varje varianttyp, beräknades (Tabell 20). MiSeqDx-programvaran använder en cutoff (effektiv LoB) på 0,026 variantfrekvens för bestämning av den kvalitativa detekteringen av varianter. Den beräknade gränsen för blankprov bekräftade att den här cutoff-frekvensen ger ett typ I-fel på högst 0,01.

Tabell 20 Gräns för blankprov

Varianttyp	Totalt antal variantfrekvenser	LoB för reagensparti 1 (%)	LoB för reagensparti 2 (%)
SNV	3 120	0,87	0,75
Insertion	540	0,79	0,60
Deletion	540	0,96	0,84

För LoD beräknades hur stor procentandel av den enskilda mutationsfrekvensen för varje reagensparti, för varje varianttyp, som låg under cutoff på 0,026 (Tabell 21). Eftersom procentandelarna var lägre än typ II-felet på 5 % (0,05) beräknades medianvärdet för de kombinerade variantfrekvenserna som LoD (Tabell 22). LoD för varje varianttyp fastställdes som det större av de två värden som beräknats för de två reagenspartierna, 5,45 % för SNV:er, 4,88 % för insertioner och 5,44 % för deletioner.

Tabell 21 Detekteringsgräns

Reagensparti	Varianttyp	Totalt antal variantfrekvenser	Antal VF-mätningar < 2,6 %	% av VF-mätningar < 2,6 %	Detekteringsgräns (%)
1	SNV	2 080	5	0,20	5,45
	Insertion	360	0	0,00	4,86
	Deletion	360	3	0,80	5,44
2	SNV	2 080	26	1,30	5,44
	Insertion	360	0	0,00	4,88
	Deletion	360	0	0,00	5,24

Följande studier visar prestandaegenskaperna för MiSeqDx med en annan representativ analys för 56 mutationer i två kliniskt relevanta cancergener (mutationspanel). Mutationspanelen är utformad för att specifikt detektera 56 mutationer i två kliniskt relevanta cancergener (Gen 1 och Gen 2). Vid analysen bestäms samtidigt närvaron eller frånvaron av var och en av de 56 mutationerna i varje sekvenserat prov. Referensmetoden för studierna var dubbelriktad Sanger-sekvensering.

Precision mellan partier

Studie av precisionen mellan olika partier genomfördes för att utvärdera MiSeqDx-instrumentets prestanda för tillverkade reagenspartier (bestående av provkvalificering, bibliotekspreparering och sekvenseringsreagens) med hjälp av den representativa tvågensanalysen och en panel med fem blandade FFPE-prover som uppfyllde kvalificeringskraven för proverna. Varje FFPE-prov innehöll två unika mutationer: en på en lägre mutationsfrekvensnivå (cirka 8 %) och en på en hög mutationsfrekvensnivå (cirka 14 %). Tolv (12) observationer av var och en av de fem provblandningarna samlades in under tre icke på varandra följande dagar med tre reagenspartier. Under studien var det totala antalet observationer för alla reagenspartier 180 för alla provblandningar och 360 för alla mutationsfrekvensnivåer. För alla partier och dagar visade 99,7 % (359/360) av observationerna det förväntade mutationsresultatet. En lågfrekvensmutation fick felaktigt bestämningen vildtyp. En varianskomponentanalys utfördes för var och en av mutationerna/mutationsfrekvensnivåerna för att uppskatta systemets variabilitet. Den totala standardavvikelsen varierade mellan 0,011 och 0,029. Reagenspartikomponenten för den totala standardavvikelsen varierade mellan 0 och 0,015.

Patent och varumärken

Dokumentet och dess innehåll tillhör Illumina, Inc. och dess dotterbolag ("Illumina") och är endast avsett för användning enligt avtal i samband med kundens bruk av produkterna som beskrivs häri. Allt annat bruk är förbjudet. Dokumentet och dess innehåll får ej användas eller distribueras i något annat syfte och/eller återges, delges eller reproduceras på något vis utan föregående skriftligt tillstånd från Illumina. I och med detta dokument överlåter Illumina inte någon licens som hör till dess patent, varumärke eller upphovsrätt, eller i enlighet med rättspraxis eller liknande tredjepartsrättigheter.

Instruktionerna i detta dokument ska följas till punkt och pricka av kvalificerad och lämpligt utbildad personal för att säkerställa rätt och säker produktanvändning i enlighet med beskrivning häri. Hela innehållet i dokumentet ska läsas och förstås i sin helhet innan produkten (produkterna) används.

FÖRSUMMELSE ATT FULLSTÄNDIGT LÄSA OCH FÖLJA ALLA INSTRUKTIONER HÄRI KAN MEDFÖRA SKADA PÅ PRODUKTER, PERSONSKADA, INKLUSIVE SKADA PÅ ANVÄNDAREN ELLER ANNAN PERSON, SAMT SKADA PÅ ANNAN EGENDOM.

ILLUMINA KAN INTE ÅLÄGGAS NÅGOT ANSVAR SOM UPPKOMMER GENOM FELAKTIG ANVÄNDNING AV PRODUKTERNA SOM BESKRIVS HÄRI (INKLUSIVE DELAR DÄRI ELLER PROGRAM).

© 2021 Illumina, Inc. Med ensamrätt.

Illumina, MiSeqDx, TruSeq, "pumpkin orange"-färgen och "streaming bases"-designen är varumärken som tillhör Illumina, Inc. och/eller dess dotterbolag i USA och/eller andra länder. Alla andra namn, logotyper och varumärken tillhör respektive ägare.

Kontaktinformation



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 USA
+1 800-8094566
+1 858-2024566 (utanför Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

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

Märkning av produkter

Fullständig information om de symboler som visas på förpackning och etiketter finns i symbolförklaringen på support.illumina.com på fliken *Documentation and Literature* (dokumentation och litteratur) för ditt produktpaket.