

# MiSeqDx<sup>®</sup>-instrument

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK

Katalognr. DX-410-1001

## Tiltenkt bruk

MiSeqDx-instrumentet er beregnet for målrettet sekvensering av DNA-biblioteker fra humant genomisk DNA ekstrahert fra perifert fullblod eller formalinfiksert, parafininnstøpt (FFPE) vev når det brukes sammen med *in vitro*-diagnostiske (IVD) analyser utført på instrumentet. MiSeqDx-instrumentet skal ikke brukes til helgenom- eller *de novo*-sekvensering. MiSeqDx-instrumentet skal brukes med registrerte og oppførte, klarerte eller godkjente IVD-reagenser og -analyseprogramvare.

## Prosedyreprinsipper

Illumina MiSeqDx er beregnet for målrettet resekvensering av humant DNA ved hjelp av Illumina-sekvenseringsmaterieell og biblioteker som er klargjort fra humant genomisk DNA ekstrahert fra perifert fullblod eller FFPE-vev ved hjelp av registrerte og oppførte, klarerte eller godkjente IVD-reagenser. Biblioteker klargjøres ved å forsterke mål og tilføye prøveindekser og innfangingssekvenser. Prøvebiblioteker blir fanget på en strømningscelle og sekvensert på instrumentet ved bruk av sekvensering ved syntesekjemi (SBS). SBS-kjemi bruker en reversibel terminator metode for å detektere enkle nukleotidbaser idet de blir inkorporert i voksende DNA-strenger. Programvaren for sanntidsanalyse (Real-Time Analysis – RTA) utfører bildeanalyser og basebetegnelse, og tildeler en kvalitetsscore til hver base for hver sekvenseringssyklus. Når primæranalysen er ferdig, vil sekundæranalysen på MiSeqDx-instrumentet behandle basebetegnelser. Behandling omfatter demultipleksing, FASTQ-filgenerering, innretting, variantbetegnelse og generering av VCF-filer (variantbetegnelsesfiler) som inneholder informasjon om varianter funnet ved spesifikke posisjoner i et referansegenom. MiSeqDx bruker forskjellige moduler for sekundæranalyse avhengig av arbeidsprosessen. Det finnes moduler for arbeidsprosessene kimbane- eller somatisk variantbetegnelse, og moduler for analyser med spesifikke tiltenkte brukere.

## Dobbeltoppstart-konfigurasjon

Dobbeltoppstart-konfigurasjonen inkluderer maskinvaren, programvaren og installasjonsprosedyrene som gjør det mulig for MiSeqDx-instrumentet å kjøre sekvenseringsanalyser for både *in vitro*-diagnostikk (IVD) og kun til forskningsbruk (RUO). Dobbeltoppstart-konfigurasjonen gjør det mulig for brukeren å veksle mellom instrumentets diagnostikkmodus og forskningsmodus. RFID-er på sekvenseringsmaterieell forhindrer at RUO-sekvenseringsreagenser brukes i diagnostiske sekvenseringskjøringer.

## Prosedyremessige begrensninger

- 1 Til *in vitro*-diagnostisk bruk.
- 2 Resultater angitt i merkingen ble oppnådd ved å bruke representative analysepaneler med perifert fullblod eller cellelinjer for kimbaneytelse og FFPE-vev eller FFPE-cellelinjer for somatisk ytelse, og de reagensene og programvaremodulene som er beskrevet. Ytelseskarakteristikkene er kun til informasjon. Valideringstesting som er angitt, slik det kreves av spesialkontrollene for High Throughput DNA-sekvensanalytatorer, er kun ment som et eksempel på instrumentets generelle ytelse, og fastsetter ikke instrumentets ytelse eller egnethet med hensyn til eventuelle spesifikke krav. Alle diagnostiske tester som er utviklet for bruk på dette instrumentet, krever full validering med hensyn til alle ytelsesaspekter.
- 3 Dette produktet er begrenset til å levere:
  - Sekvenseringsutgang  $\geq 5$  Gb
  - Avlesinger som passerer filter  $\geq 15$  millioner
  - Avlesingslengde (i parvis endekjøring)  $2 \times 150$  bp

- Baser høyere enn Q30  $\geq 80$  % ved avlesingslengde på 2 x 150 bp  
80 % eller mer av basene har en kvalitetsscore på Phred-skalaen som er høyere enn 30, noe som indikerer en nøyaktighet av basebetegnelse på mer enn 99,9 %.
- 4 MiSeqDx-instrumentet har kun blitt validert for å sekvensere humant DNA-biblioteker ekstrahert fra perifert fullblod og FFPE-vev. Biblioteker generert fra andre prøvetyper skal ikke brukes med dette instrumentet til *in vitro*-diagnostisk bruk. Ytelsen til dette instrumentet ved sekvensering av mikrobielle nukleinsyrer fra kliniske prøver har ikke blitt fastslått.
- 5 MiSeqDx er beregnet for *in vitro*-diagnostisk bruk med registrerte og oppførte, klarerte eller godkjente IVD-reagenser eller -analyser. MiSeqDx-instrumentet kan brukes til *in vitro*-diagnostisk bruk med følgende IVD-analyser eller registrerte reagenser.

Navn	Katalognr.	Pakningsvedleggets dokumentnr.
Praxis® Extended RAS Panel (kun USA)	20012431	1000000037190
MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse	DX-102-1004 DX-102-1003	15038347
MiSeqDx klinisk sekvenseringsanalyse for cystisk fibrose	DX-102-1001	15038344
TruSeq Custom Amplicon Kit Dx	20005718	1000000029772
MiSeqDx Reagent Kit v3	20012552 / 20037124	1000000030849

Universelle reagensbegrensninger og ytelseskaraktistikker beskrevet i dette pakningsvedlegget er basert på representative analyser. For IVD-analyser, se det analysespesifikke pakningsvedlegget for tiltenkt bruk, varianter som detekteres, og prøvetype.

- 6 Indel-innhold (innsetninger, slettinger og kombinasjoner av disse) med en lengde på mer enn 25 bp innrettes ikke av analyseprogrammet. Derfor kan indeler med en lengde på mer enn 25 bp ikke detekteres av analyseprogrammet.
- 7 Systemet er validert for deteksjon av enkle nukleotidvarianter (SNV) og opptil 25 bp slettinger og 24 bp innsetninger når det brukes med Germline og Somatic Variant-modulprogramvaren. For somatisk betegnelse ved en variantfrekvens på 0,05 ble 25 bp slettinger og 18 bp innsetninger detektert.
- 8 PCR-produktavlesinger med ekstremt variantinnhold kan kanskje ikke innrettes av analyseprogrammet, noe som resulterer i at regionen blir rapportert som villtype. Slikt ekstremt innhold omfatter:
  - avlesinger som inneholder mer enn tre indeler,
  - avlesinger med lengde på minst 30 bp med SNV-innhold på mer enn 4 % av den totale PCR-produktmållengden (unntatt probeområder), og
  - avlesinger med lengde på mindre enn 30 bp med SNV-innhold på mer enn 10 % av den totale PCR-produktlengden (inkludert probeområder).
- 9 Store varianter, deriblant multi-nukleotidvarianter (MNV-er) og store indeler, kan rapporteres som separate mindre varianter i utdata-VCF-filen.
- 10 Slettingsvarianter kan filtreres eller utelates når de spenner over to sidestilte PCR-produkter, dersom slettelengden er større enn eller lik overlappingen mellom de sidestilte PCR-produktene.
- 11 Systemet kan ikke oppdage indeler hvis de oppstår rett ved siden av en primer og det ikke er noe overlappende PCR-produkt. For regioner med overlappende PCR-produkter kan ikke analysen oppdage slettinger når overlappingsområdet er mindre enn størrelsen på slettingen som skal detekteres. Hvis for eksempel overlappingsområdet mellom to tilstøtende PCR-produkter er to (2) baser, kan analysen ikke oppdage noen slettinger som inkluderer begge disse basene. En enkelt basesletting på én av disse basene kan detekteres.
- 12 Som ved alle hybridiseringsbaserte arbeidsprosesser for bibliotekklargjøring kan underliggende polymorfismer eller mutasjoner, innsetninger eller slettinger i oligonukleotidbindende områder påvirke allelene som sonderes, og derfor også betegnelsene som utføres under sekvensering. Eksempel:
  - En variant i fase med en variant i primerregionen kan ikke forsterkes, noe som resulterer i en falskt negativ.
  - Varianter i primerområdet kan forhindre forsterkningen av referanseallelen, noe som resulterer i feil homozygot variantbetegnelse.

- Indelvarianter i primerregionen kan forårsake en falskt positiv betegnelse på slutten av avlesingen ved siden av primeren.
- 13 Indeler kan filtreres på grunn av strengeavvik hvis de forekommer nær enden av en avlesing og "soft-clipped" under innretting.
- 14 Små MNV-er har ikke blitt validert.
- 15 Kopinumervarianter eller strukturvarianter, for eksempel fusjoner eller translokasjoner, er ikke validert.
- 16 Kimbanespesifikke begrensninger:
- MiSeqDx-systemet som bruker Germline Variant-modulen, er utviklet for å levere kvalitative resultater for kimbanevariantbetegnelse (dvs. homozygot, heterozygot, villtype).
  - Ved bruk med Germline Variant-modulen er den minimale dekningen per PCR-produkt som er nødvendig for nøyaktig variantbetegnelse, 150x. Antallet prøver og det totale antallet baser som er målrettet, påvirker dekningen. GC-innhold og annet genomisk innhold kan påvirke dekning.
  - Variasjon i kopinummer kan påvirke om en variant identifiseres som homozygot eller heterozygot.
  - Varianter i en viss repetitiv kontekst filtreres ut i VCF-filene. RMxN-gjentakelsesfilteret brukes til å filtrere varianter dersom hele eller deler av variantsekvensen er til stede gjentatte ganger i referansegenomet ved siden av variantposisjonen. For kimbanevariantbetegnelse er det nødvendig med minst 9 repetisjoner i referansen for at en variant skal filtreres, og bare gjentakelser med lengde på opptil 5 bp vurderes (R5x9).
- 17 Somatisk-spesifikke begrensninger:
- MiSeqDx-systemet som bruker Somatic Variant-modulen, er utviklet for å levere kvalitative resultater for somatisk variantbetegnelse (dvs. tilstedeværelse av en somatisk variant med en variantfrekvens som er større enn eller lik 0,026 med en deteksjonsgrense på 0,05).
  - Ved bruk med Somatic Variant-modulen er den minimale dekningen per PCR-produkt som er nødvendig for nøyaktig variantbetegnelse, 450x per oligonukleotidsammenslåing. Antallet prøver og det totale antallet baser som er målrettet, påvirker dekningen. GC-innhold og annet genomisk innhold kan påvirke dekning.
  - Varianter i en viss repetitiv kontekst filtreres ut i VCF-filene. RMxN-gjentakelsesfilteret brukes til å filtrere varianter dersom hele eller deler av variantsekvensen er til stede gjentatte ganger i referansegenomet ved siden av variantposisjonen. For somatisk variantbetegnelse er det nødvendig med minst 6 repetisjoner i referansen for at varianten skal filtreres, og bare gjentakelser med lengde på opptil 3 bp vurderes (R3x6).
  - Somatic Variant-modulen kan ikke skille mellom kimbane-varianter og somatiske varianter. Modulen er konstruert for å detektere varianter over en rekke variantfrekvenser, men variantfrekvens kan ikke brukes til å skille mellom somatiske varianter og kimbane-varianter.
  - Normalt vev i prøven påvirker deteksjonen av varianter. Den rapporterte deteksjonsgrensen er basert på en variantfrekvens relativ til det totale DNA-et som ekstraheres fra både tumor og normalt vev.

## Produktkomponenter

Illumina MiSeqDx omfatter:

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

Følgende programvarekomponenter kreves til MiSeqDx-instrumentets drift og dataanalyse:

Programvareapplikasjon	Funksjon	Beskrivelse
MiSeq Operating Software (MOS)	Kontrollerer instrumentbetjening	MOS-programvaren styrer betjeningen av instrumentet under sekvensering og genererer bilder til bruk med programvaren for sanntidsanalyse (RTA). For mer informasjon, se <i>MiSeqDx-referanseveiledning for instrumenter med MOS v2 (dokumentnr. 1000000021961)</i> .

Programvareapplikasjon	Funksjon	Beskrivelse
Programvare for sanntidsanalyse (RTA)	Utfører primære analyser	RTA-programvaren konverterer bildene generert av MOS for hver plate per syklus av sekvenseringskjøringen til basebetegnelsesfiler, som er innganger for Local Run Manager-analysemoduler. RTA-programvaren inneholder ikke et brukergrensesnitt.
Local Run Manager	Grensesnitt for modulvalg	Local Run Manager-programvaren er en instrumentintegret oppløsning for å administrere brukere, utføre sekundæranalyse og overvåke status. For mer informasjon, se <i>Referanseveiledning for Local Run Manager-programvare for MiSeqDx (dokumentnr.100000011880)</i> .
Somatic Variant-modul	Utfører sekundæranalyse	Denne Local Run Manager-analysemodulprogramvaren behandler basebetegnelser gjennom sekundæranalyse. Behandlingen inkluderer demultipleksing, FASTQ-filgenerering, innretting, variantbetegnelse og rapportering. Variantbetegneren (Pisces) genererer VCF-filer som inneholder informasjon om varianter funnet ved spesifikke posisjoner i et referansegenom, og inkluderer den målte variantfrekvensen.
Germline Variant-modul	Utfører sekundæranalyse	Denne Local Run Manager-analysemodulprogramvaren behandler basebetegnelser gjennom sekundæranalyse. Behandlingen inkluderer demultipleksing, FASTQ-filgenerering, innretting, variantbetegnelse og rapportering. Variantbetegneren (Pisces) genererer VCF-filer som inneholder informasjon om varianter funnet ved spesifikke posisjoner i et referansegenom, og identifiserer hver variant som heterozygot eller homozygot.

## Oppbevaring og håndtering

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

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

### Forbruksmateriell til sekvensering

MiSeqDx Reagent Kit v3 (katalognr. 20012552 / 20037124)

### Forbruksmateriell skaffet av brukeren

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

Forbruksmateriell	Formål
Spritservietter, 70 % isopropyl eller etanol, 70 %	Rengjøring av strømningscelleglass og -hulle
Laboratorieklut, lavt loinnhold	Rengjøring av strømningscellestadium
Linsepapir, 10 x 15 cm.	Rengjøring av strømningscellen
Tween 20	Vaske instrumentet
Pinsett, firkantet spiss i plast (ekstrautstyr)	Fjerne strømningscelle fra strømningscellens transportbeholder
Vann, laboratoriekvalitet	Vaske instrumentet

## Retningslinjer for vann av laboratoriekvalitet

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

Alle følgende eksempler er godkjent:

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

## Advarsler og forholdsregler

### FORSIKTIG

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

- 1 **Enkelte komponenter i reagenser fra Illumina som skal brukes med MiSeqDx-instrumentet, inneholder potensielt farlige kjemikalier. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk verneutstyr, inkludert vernebriller, hansker og laboratoriefrakk som er egnet ved risiko for eksponering. Brukte reagenser skal behandles som kjemisk avfall og kastes i samsvar med gjeldende regionale, nasjonale og lokale lover og forskrifter.** Hvis du ønsker ytterligere informasjon om helse, miljø og sikkerhet, kan du se [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
- 2 Alle blodprøver skal håndteres som om det finnes en smittefare med humant immunsviktvirus (HIV), humant hepatitt B-virus (HBV) og andre blodbårne patogener (universelle forholdsregler).
- 3 Hvis du unnlater å følge prosedyrene som beskrevet, kan det resultere i feil resultater eller betydelig reduksjon i prøve kvaliteten.
- 4 Bruk rutinemessige forholdsregler for laboratoriet. Ikke pipetter med munnen. Ikke spis, drikk eller røyk i tilordnede arbeidsområder. Bruk engangshansker og laboratoriefrakker når du håndterer prøver og settreagenser. Vask hendene grundig etter å ha håndtert prøvene og settreagensene.
- 5 God laboratoriepraksis og god laboratoriehygiene er påkrevd for å hindre at PCR-produkter kontaminerer reagenser, instrumentering og genomiske DNA-prøver. PCR-kontaminasjon kan medføre unøyaktige og upålitelige resultater.
- 6 For å hindre kontaminasjon må du påse at preforsterknings- og postforsterkningsområdene har sitt eget utstyr og materiell (for eksempel pipetter, pipettespisser, varmeblokker, vortekser og sentrifuger).
- 7 Indeks-prøvesammenkobling må samsvare nøyaktig med det trykte plateoppsettet. Local Run Manager fyller automatisk ut indeksprimerene som er tilknyttet prøvenavnene, når de er angitt i modulen. Brukeren anbefales å verifisere indeksprimerne som er assosiert med prøvene, før sekvenseringskjøringen startes. Misforhold mellom prøven og plateoppsettet resulterer i tap av positiv prøveidentifikasjon og uriktig resultatrapportering.
- 8 Installasjon av brukerlevert antivirusprogramvare anbefales sterkt for å beskytte datamaskinen mot virus. Se brukerhåndboken for instruksjoner om installasjon.
- 9 Ikke bruk MiSeqDx når noen av panelene fjernet. Betjening av instrumentet med noen av dekslene fjernet utgjør mulig eksponering for nettspenning og likespenning.
- 10 Ikke berør strømningscellehyllen i strømningscellekammeret. Varmeenheten i dette kammeret fungerer mellom 22 °C og 95 °C og kan forårsake brannskade.
- 11 Instrumentet veier omtrent 57 kg og kan forårsake alvorlig skade hvis det faller ned eller behandles på feil måte.

## Bruksanvisning

Følgende instruksjoner for bruk av MiSeqDx-instrumentet krever reagenser fra MiSeqDx Reagent Kit v3.

## Opprette kjøring med Local Run Manager

Du finner detaljerte instruksjoner i *Referanseveiledning for Local Run Manager-programvare for MiSeqDx* (dokumentnr. 100000011880) og Local Run Manager-modulveiledningen for analysemodulen du bruker.

- 1 Velg **Create Run** (Opprett kjøring) og velg Local Run Manager-modulen for Somatic Variant eller Germline Variant.
- 2 Skriv inn et kjørningsnavn som identifiserer kjøringen fra sekvensering til og med analyse.
- 3 Bruk alfanumeriske tegn, mellomrom, understreker eller bindestreker.
- 4 [Valgfritt] Angi en kjørningsbeskrivelse for å identifisere kjøringen.  
Bruk alfanumeriske tegn, mellomrom, understreker eller bindestreker.

## Importere manifestfiler for kjøringen

- 1 Kontroller at manifestene du vil importere, er tilgjengelige på en nettverksplassing som er koblet til instrumentet, eller på en USB-stasjon.
- 2 Velg **Import Manifests** (Importer manifeste).
- 3 Naviger til manifestfilen, og velg manifestene du vil legge til.

## Angi prøver for kjøringen


Angi prøver for kjøringen ved hjelp av følgende alternativer:

**Enter samples manually** (Angi prøver manuelt) – Bruk den tomme tabellen i skjermbildet Create Run (Opprett kjøring).

**Import samples** (Importer prøver) – Naviger til en ekstern fil i format. Du kan laste ned en mal i skjermbildet Create Run (Opprett kjøring).

Etter at du har fylt ut prøvetabellen, kan du eksportere prøveinformasjonen til en ekstern fil og bruke filen som referanse når du klargjør bibliotek, eller importere filen til en annen kjøring.

## Angi prøver manuelt

- 1 Velg antall prøver og indekssett fra rullegardinlisten.
- 2 Angi et unikt prøvenavn (*Somatic Variant-analysemodul*) eller prøve-ID (*Germline Variant-analysemodul*).  
Bruk alfanumeriske tegn, bindestreker eller understreker.  
For Somatic Variant-modulen vil et prøvenavn som er lagt inn for én prøvebrønn automatisk fylles ut for den tilsvarende brønnen i den andre sammenslåingen.
- 3 [Valgfritt] For positive eller negative kontrollprøver: Høyreklikk og velg kontrolltypen.  
For Somatic Variant-modulen vil et kontrollsett i én prøvebrønn automatisk fylle ut den tilsvarende brønnen i den andre sammenslåingen med samme kontroll.
- 4 [Valgfritt] Velg fanen Description (Beskrivelse) og legg inn en prøvebeskrivelse. Bruk alfanumeriske tegn, bindestreker eller understreker.  
For Somatic Variant-modulen vil en beskrivelse som er lagt inn for én prøvebrønn automatisk fylles ut for den tilsvarende brønnen i den andre sammenslåingen.
- 5 Velg fanen **Index 1 (i7)** (Indeks 1 (i7)) og velg en indeks 1-adapter fra rullegardinlisten.
- 6 Velg fanen **Index 2 (i5)** (Indeks 2 (i5)) og velg en indeks 2-adapter fra rullegardinlisten.
- 7 Velg en manifestfil fra rullegardinlisten Manifest.  
For Somatic Variant-modulen vil prøver i sammenslåing A kreve et annet manifest enn prøver i sammenslåing B.
- 8 Velg et alternativ for å vise, skrive ut eller lagre plateoppsettet som en referanse for klargjøring av biblioteker:
  - Velg ikonet  **Print** (Skriv ut) for å vise plateoppsettet. Velg **Print** (Skriv ut) for å skrive ut plateoppsettet.
  - Velg **Export** (Eksporter) for å eksportere prøveinformasjon til en ekstern fil.
- 9 Velg **Save Run** (Lagre kjøring).

## Importer prøver

- 1 Klikk på **Import Samples** (Importer prøver), og bla til plasseringen av prøveinformasjonsfilen. Det finnes to typer filer du kan importere.
  - Velg **Template** (Mal) i skjermbildet Create Run (Opprett kjøring) for å lage et nytt plateoppsett. Malfilen inneholder de riktige kolonneoverskriftene for import. Oppgi prøveinformasjon i hver kolonne for prøvene i kjøringen. Slett eksempelinformasjon i ubrukte celler, og lagre deretter filen.
  - Bruk en fil med prøveinformasjon som ble eksportert fra analysemodulen ved hjelp av funksjonen Export (Eksport).
- 2 Klikk på ikonet **Print** (Skriv ut) for å vise plateoppsettet.
- 3 Velg **Print** (Skriv ut) for å skrive ut plateoppsettet som en referanse for klargjøring av biblioteker.
- 4 Velg **Save Run** (Lagre kjøring).

## Klargjøre reagenskassetten

Følgende instruksjoner beskriver hvordan reagensene skal tines i vannbad med romtemperatur.

- 1 Ta reagenskassetten ut fra oppbevaring på  $-15^{\circ}$  til  $-25^{\circ}\text{C}$ .
- 2 Legg reagenskassetten i et vannbad som har tilstrekkelig avionisert vann med romtemperatur til at bunndelen av reagenskassetten når opp til vannlinjen som er trykket på reagenskassetten. Ikke la vannet komme høyere enn maksimum vannlinje.

Figur 1 Maksimum vannlinje



- 3 La reagenskassetten tine i vannbadet med romtemperatur i omtrent 60–90 minutter eller til den er fullstendig opptint.
- 4 Ta kassetten opp av vannbadet og bank den forsiktig på benken for å fjerne vann fra bunndelen av kassetten. Tørk av bunndelen av kassetten. Påse at det ikke har kommet vann på den øvre delen av reagenskassetten.

## Kontrollere reagenskassetten

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

### MERK

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

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

### MERK

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

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

## Klargjøre prøver for sekvensering

For instruksjoner om hvordan du klargjør prøvebiblioteker for sekvensering, inkludert bibliotekfortynning og -sammenslåing, se bruksanvisningen i pakningsvedlegget for bibliotekklargjøring.

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

## Laste inn prøvebiblioteker på kassetten

Når reagenskassetten er fullstendig opptint og klar for bruk, kan prøvene lastes inn i kassetten.

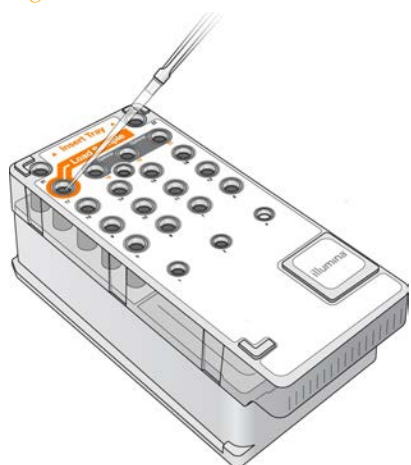
- 1 Bruk en separat, ren og tom 1 ml pipettespiss til å gjennomhulle folieforseglingen over reservoaret på reagenskassetten merket **Load Samples** (Last inn prøver).

### MERK

Ikke gjennomhull noen annen reagensposisjon. Andre reagensposisjoner blir automatisk gjennomhullet i løpet av kjøringen.

- 2 Pipetter 600 µl av **DAL**-prøvebibliotekene til beholderen merket **Load Samples** (Last inn prøver). Unngå å ta på folieforseglingen.
- 3 Sjekk for luftbobler i reservoaret etter at prøven er lastet inn. Hvis luftbobler er til stede, banker du kassetten forsiktig mot benken for å frigjøre boblene.

Figur 2 Laste inn biblioteker



- 4 Gå direkte til kjøringsoppsett-trinnene ved hjelp av MiSeq Operating Software (MOS)-grensesnittet.

## Kjøringsoppsett

Du finner detaljerte instruksjoner om kjøringsoppsett i *MiSeqDx-referanseveiledningen for instrumenter med MOS v2* (dokumentnr. 100000021961).

- 1 Logg på MiSeqDx med det personlige passordet for Local Run Manager-programvaren.
- 2 Fra startskjermbildet i MOS -programvaren velger du **Sequence** (Sekvens).
- 3 Velg en kjøring fra listen, og velg deretter **Next** (Neste).  
En rekke skjermbilder for kjøringsoppsett åpnes i følgende rekkefølge: Load Flow Cell (Last inn strømningscelle), Load Reagents (Last inn reagenser), Review (Gjennomgang) og Pre-Run Check (Før kjøring-kontroll).
- 4 Når skjermbildet Load Flow Cell (Sett inn strømningscelle) vises, skal strømningscellen rengjøres og lastes inn.
- 5 Lukk strømningscellesperren og døren til strømningscellekammeret.  
Både sperren og kammerdøren skal være lukket før kjøringen begynner. Når strømningscellen er satt inn, vil programvaren lese av og registrere RFID-en. En bekreftelse om at RFID var avlest vises nederst i høyre hjørne på skjermen.
- 6 Følg ledeteksten i programvaren for å laste inn flasken med MiSeqDx SBS-oppløsning (PR2), sørg for at avfallsflasken er tom og last inn reagenskassetten.  
Når flasken med MiSeqDx SBS-oppløsningen (PR2) og reagenskassetten er lastet inn, vil programvaren lese av og registrere RFID-en. En bekreftelse om at RFID var avlest vises nederst i høyre hjørne på skjermen.
- 7 Skjermbildet Sequencing (Sekvensering) åpnes når kjøringen begynner. Dette skjermbildet gir en visuell fremstilling av kjøringens fremgang, inkludert intensiteter og kvalitetscore (Q-score).



## Resultater

Real-Time Analysis (RTA) er en integrert programvare som utfører bildeanalyse og basebetegnelse, og tildeler en kvalitetsscore til hver base for hver sekvenseringssyklus. Når primæranalysen er ferdig, vil modulen på MiSeqDx-instrumentet som er valgt i *Opprette kjøring med Local Run Manager* på side 6, starte sekundæranalysen, som beskrevet her.

### Demultipleksing

Demultipleksing sammenligner hver indeksavlesingssekvens med indekssekvensene som er angitt for kjøringen. Ingen kvalitetsverdier vurderes på dette trinnet.

Indeksavlesinger identifiseres ved hjelp av følgende trinn:

- Prøvene er nummerert fra 1 basert på rekkefølgen de er oppført i for kjøringen.
- Prøvenummer 0 er reservert for klynger som ikke ble tildelt noen prøve.
- Klynger tilordnes en prøve når indekssekvensen samsvarer nøyaktig, eller når det er opptil ett misforhold per indeksavlesing.

### FASTQ-filgenerering

Etter demultipleksing genererer programvaren mellomliggende analysefiler i FASTQ-formatet, som er et tekstformat som brukes til å representere sekvenser. FASTQ-filer inneholder avlesinger for hver prøve og tilhørende kvalitetsscore. Eventuelle kontroller brukt til kjøringen og klynger som ikke passerte filteret, blir ekskludert.

Hver FASTQ-fil inneholder avlesinger for bare én prøve, og navnet på denne prøven er inkludert i FASTQ-filnavnet. I arbeidsprosessen for somatisk variant genereres fire FASTQ-filer per prøve (to per oligonukleotid-pool), to fra Read 1 og to fra Read 2. FASTQ-filer er primære inndata for innretting.

### Innretting

Under innrettingstrinnet innretter den bundne Smith-Waterman-algoritmen klynger fra hver prøve med PCR-produktsekvenser spesifisert i manifestfilen.

Den bundne Smith-Waterman-algoritmen utfører halvglobal sekvensinnretting for å bestemme lignende regioner mellom to sekvenser. I stedet for å sammenligne den totale sekvensen, sammenligner Smith-Waterman-algoritmen segmenter med alle mulige lengder.

Hver paired-end-avlesing blir evaluert med hensyn til sin innretting med de relevante probesekvensene for denne avlesingen.

- Read 1 evalueres mot reverskomplementet av nedstrøms lokusspesifikt oligo (DLSO).
- Read 2 evalueres mot oppstrøms lokusspesifikt oligo (ULSO).
- Hvis starten på en avlesing samsvarer med en probesekvens med ikke mer enn tre ulikheter (misforhold eller forskyvninger på grunn av ledende indeler), innrettes den fulle lengden av avlesingen mot PCR-produktmålet for den sekvensen.
- Indeler innenfor DLSO og ULSO blir ikke observert på grunn av analysekjemien.

Innrettingsresultater registreres i innrettingsfiler (BAM-filer). Avlesinger filtreres fra innrettingsresultater basert på antall misforhold over enten interesseområdet eller hele PCR-produktet, avhengig av PCR-produktlengden.

Filtrerte avlesinger registreres i innrettingsfiler, men flagges som uinnrettede og brukes ikke i variantbetegnelse.

### Variantbetegnelse

Variantbetegneren (Pisces) er designet for å lage SNV-, MNV- og indelvariantbetegnelser fra biblioteker som er klargjort for instrumentet.

## Rapporter og andre utdatafiler

Variantanalysemodulene produserer PDF- og tabulatoravgrensede (\*.txt) rapporter som viser metrikk som f.eks. sekvenseringsdybde og variantantall. Modulene produserer også utdatafiler som f.eks. VCF-filer og genom Variant Call Format (gVCF)-filer.

## Kvalitetskontrollprosedyrer

MiSeqDx-programvaren evaluerer hver kjøring, prøve og basebetegnelse mot kvalitetskontrollmetrikk. De positive og negative kontrollene inkludert i bibliotekklargjøring, skal også evalueres. Slik evaluerer du sekvenseringskontrollresultatene for kontrollene:

- Hvis en No Template Control (Ingen malkontroll) genererer en betegnelsesfrekvens > 10 %, kan det ha oppstått en feil i prøvesporing, feil registrering av indekseringsprimere eller kontaminasjon i No Template Control (Ingen malkontroll). Protokollen anses å være mislykket, og hele protokollen må gjentas fra bibliotekklargjøring.
- Den positive kontrollprøven må generere det forventede resultatet. Hvis den positive kontrollen genererer et annet resultat enn det som er forventet, kan det ha oppstått en feil i prøvesporing eller feil registrering av indekseringsprimere. Hele protokollen må gjentas fra bibliotekklargjøring.

## Ytelseskarakteristikker

Kimbanestudier brukte enten MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-variantanalysen eller TruSeq Custom Amplicon Kit Dx-reagensene til bibliotekklargjøring. De to settene bruker identiske bibliotekklargjøringsreagenser og har bare én arbeidsprosessforskjell: antall sykluser med polymerasekjedereaksjoner (PCR) (henholdsvis 25 og 28). De ekstra PCR-syklusene tillater lavere DNA-innmating med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (50 ng) sammenlignet med MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-variantanalysen (250 ng), som vist i DNA-innmatingstudien ved hjelp av TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Biblioteker som var klargjort med MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-variantanalysen, ble sekvensert med sekvenseringsreagensene som fulgte med settet. Biblioteker som var klargjort med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, ble sekvensert med MiSeqDx Reagent Kit v3. Sistnevnte sekvenseringsreagenser har økt ytelse sammenlignet med reagensene i MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-variantanalysen.

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

Alle studier ble utført på MiSeqDx. Kimbanearbeidsprosessen eller den somatiske arbeidsprosessen, som beskrevet for TruSeq Custom Amplicon Kit Dx for å klargjøre biblioteker for sekvensering, ble etterfulgt av analyse med henholdsvis Germline- eller Somatic Variant-modulen, med to unntak. Studier som brukte ett gen (kimbaneytelse; MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-variantanalyse) eller to gener (somatisk ytelse) som representative mutasjonspaneler, brukte analysespesifikke arbeidsprosesser og analysemoduler.

Merk: Genomisk innhold i PCR-produkt er oppsummert i forhold til den genomiske strengen som er sekvensert. For amplikoner designet mot minus-strengen, er referansegenominnholdet reverskomplementet (f.eks. polyA-regioner på minus-strengamplikoner svarer til polyT-regioner på referansegenomet).

### Definisjoner av beregninger for ytelseskarakteristikker

- 1 Positivt prosentsamsvar (PPA) beregnes som andelen av loki klassifisert som varianter ved hjelp av en referansemetode som er korrekt rapportert av analysen.
  - $(\text{antall variantloki korrekt rapportert av analysen}) / (\text{totalt antall variantloki})$   
Variantloki rapportert av analysen som samsvarer med referansemetoden, er sant positive (TP).  
Variantloki rapportert som referansebetegnelser eller som forskjellige variantbetegnelser av analysen, er falskt negative (FN).
- 2 Negativt prosentsamsvar (NPA) beregnes som andelen av loki klassifisert som villtype ved hjelp av en referansemetode som er korrekt rapportert av analysen.
  - $(\text{Antall villtypeloki korrekt rapportert av analysen}) / (\text{totalt antall villtypeloki})$   
Villtypeloki rapportert av analysen som samsvarer med referansemetoden, er sant negative (TN).  
Villtypeloki rapportert som varianter av analysen er falskt positive (FP).

- 3 Samlet prosentamsvar (OPA) beregnes som andelen loki som er korrekt rapportert av analysen i forhold til en referansem metode.
  - $$\frac{((\text{antall variantloki korrekt rapportert av analysen}) + (\text{villtypeloki korrekt rapportert av analysen}))}{((\text{totalt antall variantloki}) + (\text{totalt antall villtypeloki}))}$$
- 4 Beregningene av PPA, NPA og OPA inkluderer ikke noen betegnelser (variant- eller referanseloki som ikke oppfyller ett eller flere kvalitetsfiltre). To studier inneholder spesifikt ikke noen betegnelser i målinger av «% korrekte betegnelser», og denne inkluderingen av ingen betegnelser er angitt for de aktuelle tabellene.
- 5 Betegnelsesfrekvens beregnes som det totale antallet lokipasserende filtre dividert med det totale antallet posisjoner som er sekvensert for kromosom 1–22. Kromosom X og Y er ekskludert. Denne målingen vurderer ikke samsvaret av betegnelser med referansemetoden.

For ytelseskaraktistikker knyttet til preanalytiske faktorer (f.eks. ekstraksjonsmetoder eller DNA-innmating), se pakningsvedlegget for gjeldende bibliotekklargjøringsmetode.

### Prøveindeksering

Prøveindeksprimere, som tilføyes under bibliotekklargjøring, tildeler en unik sekvens til hvert prøve-DNA, slik at flere prøver kan slås sammen til en enkelt sekvenseringskjøring. Prøveindeksering brukes både til kimbane- og somatisk arbeidsprosess.

Totalt 96 prøveindekser ble testet med en representativ analyse designet for et bredt utvalg av gener som dekker 12 588 baser per streng over alle 23 humane kromosomer for å verifisere analysens evne til konsekvent å lage en genotypingbetegnelse for en gitt prøve på tvers av ulike kombinasjoner av indekseringsprimere. Y-kromosomet inneholder ikke konfidensregioner og ble ikke evaluert. Åtte unike prøver ble testet med 12 ulike kombinasjoner av indekseringsprimere per prøve. Prøveresultater fra Germline-analysemodulen ble sammenlignet med Platinum Genomes-versjon 2016-01. PPA (SNV-er og indeler) oversteg 97 % (sanne positive betegnelser var minst 70 for SNV-er, 38 for innsetninger, 36 for slettinger) og NPA var 100 % (minst 23 440 referanseposisjoner per indeksskombinasjon) for hver av de 96 indeksskombinasjonene. En enkelt indeks ble testet uavhengig for å verifisere at MiSeqDx Reagent Kit v3-sekvenseringskjemien kan støtte mindre enn 8 prøver (den foregående kjemien i MiSeqDx Universal Kit 1.0 var begrenset til minimum 8 prøver). Enkeltindeksen hadde PPA-verdier på 98,9 % (180/182) for SNV-er, 100 % (38/38) for innsetninger og 100 % (46/46) for slettinger. NPA var 100 % (23 856/23 856).

Tolv replikater (24 biblioteker) av en prøve ble testet for å måle indeksnøyaktighet med somatiske varianter ved frekvenser fra 0,05 til 0,10 ved bruk av Somatic Variant-modulen (2 indeksskombinasjoner per replikat brukes til å lage somatiske betegnelser). PPA var 100 % for SNV-er (64/64), innsetninger (11/11) og slettinger (19/19). NPA var 100 % (minst 11 590 referanseposisjoner per indeksskombinasjon) for alle indeksskombinasjoner.

### Carryover av prøver

MiSeqDx-instrumentets arbeidsprosess omfatter bibliotekklargjøring og sekvensering av flere prøver pluss kontroller som alle behandles samtidig. Studien om carryover av prøver ble utført for å evaluere om falskt positive resultater pga. carryover fra brønn til brønn-kontaminasjon under prøvebibliotekklargjøring samt kjøring til kjøring-kontaminasjon mellom etterfølgende sekvenseringskjøringer, hadde innvirkning på testresultatene. Somatiske varianter ble brukt fordi de kan detekteres ved lavere allelfrekvenser enn kimbanevarianter.

Prøvene besto av fire genomiske DNA-prøver fra cellelinjer, der hver av dem inneholdt ulike panelmutasjoner i en representativ analyse med 2 gener. Prøvene var slik at en mutasjon ved en posisjon i den ene, ville ha en referansesekvens (villtype) i de andre.

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

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

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

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

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

### Ytelseskarakteristikker for kimbane

Studier beskrevet her brukte Germline Variant-modulen til å analysere sekvenseringsdata, bortsett fra de studiene som brukte panelet med ett gen, der det ble brukt en analysespesifikk modul.

### Nøyaktighet

Følgende studie ble utført for å vurdere nøyaktigheten av MiSeqDx-instrumentet med MiSeqDx Reagent Kit v3 og høykvalitets-DNA. Studien brukte en representativ analyse designet for å undersøke et bredt utvalg av gener som dekker 12 588 baser over 23 ulike kromosomer ved hjelp av 150 amplikoner. Y-kromosomet inneholder ikke konfidensregioner og ble ikke evaluert. De 12 unike prøvene som ble brukt i denne studien er fra én enkelt familie – to foreldre og 10 barn – som ofte blir sekvensert av ulike laboratorier og med ulike sekvenseringsmetoder. Det foreligger fem prøver fra kvinner og sju fra menn. Hver prøve ble testet i duplikat. Nøyaktigheten ble fastslått for SNV-er, innsetninger og slettinger ved å sammenligne studiedata med en godt karakterisert referansedatabase. Referansedatabase-sekvensen (Platinum Genomes versjon 2016-01) ble avledet av kombinasjonen av flere sekvenseringsmetoder, offentlig tilgjengelige data og arvelighetsinformasjon. Genomiske konfidensregioner ble definert basert på denne referansemetoden med mindre annet er angitt. Totalt ble prøvene kjørt 8 ganger. Tabellene nedenfor viser nøyaktighet basert på data fra den første kjøringen.

Tabell 1 inneholder studiedata som viser positivt og negativt prosentamsvar på en per prøve-basis, der variantresultatene er sammenlignet med den godt karakteriserte sammensatte referansemetoden for PPA-beregninger. De tre varianttypene (SNV-er, innsetninger og slettinger) er kombinert. Fordi referansemetoden kun gir resultater for de enkle nukleotidvariantene og innsetninger/slettinger, er ikke-variantbaseresultatene sammenlignet med referansesekvensen for humant genom, bygg hg19, for NPA-beregninger.

**Tabell 1** Samsvar av MiSeqDx-instrumentets basebetegnelsesresultater per prøve

Prøve	Gj.snittlig betegnelses-frekvens	Totalt-antall-varian-ter	Totalt-antall-TP-varian-ter	Totalt-antall-FN-varian-ter	Totalt-antall-ingen betegn-elser	Totalt-antall-TN-betegn-elser	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	152	152	0	4	24024	100	100	100
NA12878	> 99,9	270	266	0	4	23856	100	100	100
NA12879	> 99,9	192	190	1	1	24054	99,5	100	> 99,9
NA12880	> 99,9	222	220	0	6	24052	100	100	100
NA12881	> 99,9	250	247	1	2	23862	99,6	100	> 99,9

NA12882	> 99,9	200	196	2	2	23962	99,0	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	226	224	0	6	23870	100	100	100
NA12884	> 99,9	228	226	1	1	23942	99,6	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	244	240	2	2	23942	99,2	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	230	228	1	1	23888	99,6	100	> 99,9
NA12888	> 99,9	216	216	0	4	24002	100	100	100
NA12893	> 99,9	236	234	0	2	23810	100	100	100

Den representative analysen besto av 150 amplikoner designet for å dekke et bredt utvalg av genomisk innhold. GC-innholdet i amplikonene varierte fra 26–87 %. Amplikoner hadde også et utvalg av enkle nukleotid- (f.eks. PolyA, PolyT), dinukleotid- og trinukleotidgjentakelser. Data ble kompilert på en per amplikon-basis (tabell 2) for å bestemme virkningen av genomisk innhold på % riktige betegnelser. % riktige betegnelser består av variant- og referansebetegnelser og er mindre enn 100 % hvis det forekommer enten feil eller ingen betegnelser. Ingen betegnelser forekommer når ett eller flere filtre ikke oppfyller krav til variantbetegnelse (f.eks. utilstrekkelig dekning).

Av de åtte FN-variantene fra tabell 2, forekom sju med en 1 bp innsetting på amplikon 111 som også inneholder PolyA-homopolymer og GC-innhold på 0,29. Den gjenværende 1 FN (uriktig betegnelse) skyldtes en forventet heterozygot SNV, på amplikon 125 med et GC-innhold på 0,68, betegnet som en homozygot variant. SNV-variantfrekvensen var 0,71, som er over terskelen på 0,70 for klassifisering som homozygot variant. Amplikonet med laveste % riktige betegnelser (98,2 %) var amplikon 17, som hadde 40 ingen betegnelser og inneholdt AT-gjentakelser og GC-innhold på 27 %.

Tabell 2 Nøyaktighet av PCR-produktnivå for MiSeqDx-instrumentet

Amplikon	Kromosom	Amplikonstart	Amplikonslutt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensregioner	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	Totalt antall riktige betegnelser	Totalt antall uriktige betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	% riktige betegnelser
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	2232	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	2184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	2208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	2112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	2160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	N/A	0,65	1944	0	0	100

11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	2112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	N/A	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	N/A	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	2112	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1774	0	2	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1872	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	2328	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	N/A	0,29	1872	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	1488	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1656	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	N/A	0,78	1800	0	0	100

29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	2016	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	N/A	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1608	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	2184	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	2448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	2244	0	12	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	2352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	2280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	2064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	2256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	2184	0	0	100
43	7	22202176	22202148	73	73	N/A	0,44	1752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	2112	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	2088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	2160	0	0	100



48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	2184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	N/A	0,31	1584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	2232	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	N/A	0,42	1992	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	2113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	2352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	1560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	N/A	0,49	2304	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1992	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1872	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	2184	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1896	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	2160	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	2280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	N/A	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	N/A	0,51	1944	0	0	100

67	11	8159816	8159912	97	96	N/A	0,45	2304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	N/A	0,65	2400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	1488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	N/A	0,59	2448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	N/A	0,42	2040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	2184	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	2040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	0,34	2040	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	2040	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	2016	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	2232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	N/A	0,49	1944	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	2280	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	N/A	0,52	1752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	2112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	2136	0	0	100

86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1848	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	1608	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	N/A	0,25	1992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	2184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	1584	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	2256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	2304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	2232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	2280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	N/A	0,36	2184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	N/A	0,27	1512	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	2280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	2088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	2496	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	2184	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	2136	0	0	100

107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	2088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	2184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	2232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	2136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1944	7	17	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	2184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT(4), AT (4), indel	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	2064	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	2016	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1608	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	N/A	0,37	2184	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	1656	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	N/A	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	N/A	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	N/A	0,68	1775	1	0	99,9

126	19	18186574	18186643	70	70	N/A	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	N/A	0,61	2256	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1968	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1824	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	1680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	2424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1608	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	2112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	2088	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	1584	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	2352	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	2088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	1656	0	0	100
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	2160	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	2400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	N/A	0,68	2328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	2328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	N/A	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	2208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1656	0	0	100

---

146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	N/A	0,52	1704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	N/A	0,55	0	0	0	N/A
149	Y	2655519	2655609	91	0	N/A	0,48	0	0	0	N/A
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	N/A

Varianter som var ingen betegnelser, er oppsummert i tabell 3. De aktuelle filtrerne som resulterte i ingen betegnelser, er oppført i tabellen. Innsettingen på amplicon 111 ble filtrert for 9 av 16 forekomster med de gjenværende sju forekomstene betegnet som referanse, og er derfor FN-er.

**Tabell 3** Oppsummering av ingen betegnelser-varianter

Amplicon #	Kr:Pos	Variant	Tilsvarende ampliconinnhold	Filter	Utelatte varianter	Forventede varianter	FN-betegnelser
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42 % GC	R5x9 <sup>1</sup>	10	10	0
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29 % GC	R5x9	9	16	7

<sup>1</sup> R5x9: Gjentakelsesfilter. En variant filtreres hvis hele eller deler av varianten er til stede gjentatte ganger i referansegenomet ved siden av variantposisjonen. Minst 9 gjentakelser i referansen er nødvendig, og bare gjentakelser med lengde på opptil 5 bp vurderes.

Sekvenseringsresultatene for prøve NA12878 ble sammenlignet med en genotype med høy konfidens for NA12878, etablert av National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Av de 150 ampliconene var 92 ampliconer helt innenfor de genomiske regionene med høy konfidens, 41 ampliconer hadde delvis overlapping og 17 ampliconer hadde ingen overlapping i NIST-sekvensen. Dette resulterte i 10 000 koordinater per replikat for sammenligning. Ikke-variantbasebetegnelser ble sammenlignet med referansesekvensen for humant genom, bygg 19. Nøyaktighetsresultatene vises i tabell 4.

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

Prøve	Antall ampliconer	Gj.snittlig betegnelserfrekvens	Totalt antall TP-varianter	Totalt antall FN-varianter	Totalt antall TN-betegnelser	Totalt antall FP-betegnelser	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19380	0	100	100	100

Prøvene ble videre analysert for å betegne små innsetninger og slettinger (indeler) (tabell 5). I noen tilfeller var indelen vanlig blant to eller flere prøver, som vist i kolonnen «Totalt antall prøvereplikater med indel». Resultatene for begge replikater av de 12 gyldige prøvene er inkludert i tabell 5. Det var totalt 71 indeler, som varierte i størrelse fra 1–24 bp for innsetninger og 1–25 bp for slettinger. 69 indeler ble alle detektert med et positivt prosentamsvar på 100 %. Én sletting (amplikon 64; 2 bp sletting (kr10 55892600 TAC>T) hadde ingen riktige betegnelser fordi hver av disse variantene var en ingen betegnelse på grunn av R5x9-filteret5). PPA, som ekskluderer ingen betegnelser, kunne derfor ikke beregnes. En annen indel, 1 bp innsetning (kr17 39589692 C>CA) på amplikon 111, hadde heller ingen riktige betegnelser fordi 9 varianter var en ingen betegnelse på grunn av R5x9-filteret, og 7 var FN-betegnelser.

Tabell 5 Oppsummering av indeldeteksjon med MiSeqDx-instrumentet

Amplikon	Kromosom	Posisjon	Analysert fragments-tørrelse	Amplikonindel-type og -lengde	Indel	Totalt antall prøvereplikater med indel	Antall ingen betegnelser	Totalt antall uriktige indelbetegnelser	Totalt antall riktige indelbetegnelser	PPA
1	1	36450544	93	25 bp sletting	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	3 bp sletting	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	23 bp innsetning	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	17 bp sletting	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	5 bp innsetning	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	3 bp innsetning	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	90	7 bp innsetning	T>TTTGGTAA	14	0	0	14	100
9	2	87003972	80	6 bp sletting	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	87	5 bp innsetning	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	12 bp innsetning	C>CTGAAAATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	2 bp innsetning	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	23 bp sletting	TAAC TTAAAATTACAAAATAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	9 bp innsetning	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	1 bp sletting	AG>A	20	0	0	20	100



25	4	56236567	66	8 bp sletting	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	11 bp innsetting	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	4 bp sletting	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	8 bp innsetting	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	21 bp sletting	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	3 bp sletting	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32986905	95	25 bp sletting	CTTTCACCTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	23 bp sletting	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	1 bp innsetting	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	4 bp sletting	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	1 bp innsetting	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	4 bp sletting	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156476548	93	11 bp sletting	GAATCTGCACTT>G	12	0	0	12	100
52	8	24811064	90	1 bp sletting	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	4 bp innsetting	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	4 bp innsetting	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	21 bp sletting	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	3 bp sletting	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	16 bp sletting	AGCGTCTATAACCAAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55892600	89	2 bp sletting	TAC>T	10	10	0	0	N/A
68	11	30177690	70	2 bp innsetting	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59837721	62	8 bp innsetting	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100

75	11	118406328	85	8 bp sletting	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	2 bp sletting	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	21 bp innsetting	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	19 bp innsetting	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	4 bp innsetting	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	20 bp sletting	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	22 bp sletting	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58050081	81	4 bp innsetting	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	16 bp sletting	CTTGCTCTATAAACCGT>C	10	0	0	10	100
93	14	102808554	94	5 bp sletting	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	6 bp sletting	CAAAATT>C	12	0	0	12	100
96	15	77879862	95	25 bp sletting	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	3 bp innsetting	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	4 bp innsetting	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	7 bp sletting	ATTATTTC>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	1 bp sletting	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	18 bp innsetting	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	4 bp innsetting	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	1 bp innsetting	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	84	24 bp innsetting	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	4 bp sletting	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	79	12 bp sletting	TTTGTATCTGCTG>T	20	0	0	20	100

120	18	38837054	75	22 bp innsetting	T>TGTATCTTAGCAAAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	3 bp innsetting	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	85	2 bp sletting	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	70	15 bp sletting	TACTTGAGAACTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	101	5 bp innsetting	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50897361	67	11 bp innsetting	G>GGAATGTCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	16 bp sletting	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	11 bp innsetting	G>GATAAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	21 bp sletting	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	5 bp sletting	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	100	6 bp innsetting	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	5 bp innsetting	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	10 bp sletting	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

### Reproduserbarhet

To studier ble utført for å vurdere nøyaktigheten av MiSeqDx-instrumentet med cellelinjer (studie 1 og 2) eller leukocyt-utarmet blod tilsatt cellelinjer (studie 2). Studie 1 brukte flere instrumenter, studie to hadde flere analysesteder.

#### Studie 1

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

Resultatene vises på en per amplikon-basis for hvert instrument (tabell 6) for å vise reproduserbarhet for betegnelse på tvers av instrumenter. % riktige betegnelser inkluderte både uriktige og ingen betegnelser (ett eller flere filtre oppfyller ikke krav til variantbetegnelse). Instrumentene genererte lignende antall ingen betegnelser og uriktige betegnelser avhengig av det bestemte amplikonet.

Tabell 6 Resultater fra instrument-til-instrument-reproduserbarhetsstudie for MiSeqDx-instrumentet (PCR-produktnivå)

Amp-likon	Kro-mosom	Amplik-onstart	Amplik-onslutt	Analysert fragments-tørrelse	Baser i konfidens-regioner	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innh-old	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Totalt riktige beteg-ner	Totalt uriktige beteg-ner	Totalt antall ingen beteg-ner	Totalt riktige beteg-ner	Totalt uriktig-e beteg-ner	Totalt antall ingen beteg-ner
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	8832	0	0	8832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	7776	0	0	7776	0	0
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	6720	0	0	6720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	N/A	0,65	7775	1	0	7775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	7200	0	0	7200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	8448	0	0	8448	0	0
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	8352	0	0	8352	0	0

14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	N/A	0,43	8928	0	0	8928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	8761	0	167	8760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	N/A	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	6720	0	0	6720	0	0
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	8448	0	0	8448	0	0
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	7096	0	8	7096	0	8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	7488	0	0	7488	0	0
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	9312	0	0	9312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	N/A	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	5952	0	0	5952	0	0
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	6624	0	0	6624	0	0
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	N/A	0,78	7200	0	0	7200	0	0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
30	5	41069808	41069871	64	64	N/A	0,39	6144	0	0	6144	0	0

31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	7968	0	0	7968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	6432	0	0	6432	0	0
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	7200	0	0	7200	0	0
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	9792	0	0	9792	0	0
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	8979	0	45	8979	0	45
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	9408	0	0	9408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	9120	0	0	9120	0	0
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	8256	0	0	8256	0	0
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	9024	0	0	9024	0	0
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	8736	0	0	8736	0	0
43	7	22202176	22202148	73	73	N/A	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	8448	0	0	8448	0	0
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	8550	0	90	8550	0	90
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	8736	0	0	8736	0	0

49	7	154404519	154404599	81	66	N/A	0,31	6336	0	0	6336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	N/A	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	8452	0	92	8449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	6432	0	0	6432	0	0
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	9408	0	0	9408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	N/A	0,49	9216	0	0	9216	0	0
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	7968	0	0	7968	0	0
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	7488	0	0	7488	0	0
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	8644	1	91	8644	1	91
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	7584	0	0	7584	0	0
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	8640	0	0	8640	0	0
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	9120	0	0	9120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	N/A	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	N/A	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	N/A	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0

69	11	47470345	47470444	100	100	N/A	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	5952	0	0	5952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	N/A	0,59	9792	0	0	9792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	7008	0	0	7008	0	0
73	11	101347052	101347136	85	85	N/A	0,42	8160	0	0	8160	0	0
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	8160	0	0	8160	0	0
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	0,34	8160	0	0	8160	0	0
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	8160	0	0	8160	0	0
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	8064	0	0	8064	0	0
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	8928	0	0	8928	0	0
80	12	30881766	30881846	81	81	N/A	0,49	7776	0	0	7776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	6816	0	0	6816	0	0
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	9117	3	0	9119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	N/A	0,52	7008	0	0	7008	0	0
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	7392	0	0	7392	0	0
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	6432	0	0	6432	0	0



88	14	39517884	39517966	83	83	N/A	0,25	7968	0	0	7968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	7776	0	0	7776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	8736	0	0	8736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	6336	0	0	6336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	9024	0	0	9024	0	0
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	9216	0	0	9216	0	0
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	8928	0	0	8926	2	0
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	9120	0	0	9120	0	0
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	N/A	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	N/A	0,27	6048	0	0	6048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	9120	0	0	9120	0	0
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	8352	0	0	8352	0	0
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	9984	0	0	9984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	PolyT (5), indel	0,37	8736	0	0	8736	0	0
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	8544	0	0	8544	0	0
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	8347	0	5	8347	0	5

108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	8928	0	0	8928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	8544	0	0	8544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT(4), AT (4), indel	0,26	8832	0	0	8832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	7546	0	38	7547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	8256	0	0	8256	0	0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	6432	0	0	6432	0	0
118	18	6980478	6980568	91	91	N/A	0,37	8736	0	0	8736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	6624	0	0	6624	0	0
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	N/A	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	N/A	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	N/A	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	N/A	0,64	6718	2	0	6718	2	0

127	20	746056	746149	94	94	N/A	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	7296	0	0	7296	0	0
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	6432	0	0	6432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	8360	0	88	8360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	6336	0	0	6336	0	0
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	9408	0	0	9408	0	0
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	6603	0	21	6601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	8640	0	0	8640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	N/A	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	N/A	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	8832	0	0	8832	0	0
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	6624	0	0	6624	0	0
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	6624	0	0	6624	0	0

---

147	X	135290777	135290847	71	71	N/A	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	N/A	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2655519	2655609	91	0	N/A	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Resultatene fra reproduserbarhetsstudien ble analysert på en per operatør-basis ved hjelp av variantfrekvens (tabell 7). Denne analysen viste at variantfrekvenser var konsekvente for alle operatører. Gjennomsnittlige variantfrekvenser +/- 1 standardavvik vises nedenfor.

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

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

Resultatene fra reproduserbarhetsstudien for hver prøve vises sammensatt for alle ni kjøringene (tabell 8). Deteksjon er evaluert separat for hver varianttype – SNV-er, innsetninger og slettinger. Referanseposisjoner er ekskludert. Denne analysen viste at resultatene for variantene var reproduserbare på tvers av prøvene.

Tabell 8 Samsvar av MiSeqDx-instrumentets basebetegnelsesresultater per prøve

Prøve	SNV-er				Innsetninger				Slettinger			
	Totalt antall	Totalt antall TP	Totalt antall FP	Totalt antall FN	Totalt antall	Totalt antall TP	Totalt antall FP	Totalt antall FN	Totalt antall	Totalt antall TP	Totalt antall FP	Totalt antall FN
NA12877	592	592	0	0	336	336	0	0	288	288	0	0
NA12878	1456	1456	0	0	320	304	0	0	384	368	0	0
NA12879	912	912	0	0	336	320	0	2	288	288	0	0
NA12880	1072	1071	0	1	384	384	0	0	320	304	0	0
NA12881	1248	1247	0	1	384	368	0	0	368	368	0	0
NA12882	944	943	0	1	352	336	0	4	304	288	0	0
NA12883	1088	1087	0	1	368	368	0	0	352	335	0	1
NA12884	1088	1088	0	0	400	384	0	5	336	336	0	0
NA12885	1200	1189	0	7	400	382	0	4	352	336	0	0
NA12886	1104	1102	0	2	368	352	0	3	368	368	0	0
NA12888	1056	1054	0	2	368	368	0	0	304	304	0	0
NA12893	1168	1168	0	0	352	336	0	1	368	368	0	0

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

- GC-innhold  $\geq 19\%$  (alle betegnede baser i 192 av 192 sekvenserte ampliconer med 19 % GC-innhold ble riktig betegnet med ingen betegnelse-frekvens på 1,1%)
- GC-innhold  $\leq 78\%$  (alle betegnede baser i 192 av 192 sekvenserte ampliconer med 78 % GC-innhold ble riktig betegnet med null ingen betegnelser)
- PolyA-lengder  $\leq 8$  (PolyA-gjentakelse av 8 nukleotider ble riktig betegnet i 192 av 192 sekvenserte ampliconer som inneholdt PolyA = 8)

- PolyT-lengder  $\leq 10$  (PolyT-gjentakelse av 10 nukleotider ble riktig betegnet i 192 av 192 sekvenserte amplikoner som inneholdt PolyT = 10)
- PolyG-lengder  $\leq 7$  (PolyG-gjentakelse av 7 nukleotider ble riktig betegnet i 192 av 192 sekvenserte amplikoner som inneholdt PolyG = 7)
- PolyC-lengder  $\leq 6$  (PolyC-gjentakelse av 6 nukleotider ble riktig betegnet i 576 av 576 sekvenserte amplikoner som inneholdt PolyC = 6)
- Dinukleotidgjentakelseslengder  $\leq 11x$  (alle betegnede baser i 192 av 192 sekvenserte amplikoner med 11x dinukleotidgjentakelse ble riktig betegnet med ingen betegnelse-frekvens på 0,5 %)
- Trinukleotidgjentakelseslengder  $\leq 5x$  (alle betegnede baser i 192 av 192 sekvenserte amplikoner med 5x trinukleotidgjentakelse ble riktig betegnet med ingen betegnelse-frekvens på 0,5%)
- 24 eller færre baseinnsetninger og 25 eller færre baseslettinger
  - 24-baseinnsetninger ble riktig betegnet i 192 av 192 prøver
  - 25-baseslettinger ble riktig betegnet i 223 prøver og uriktig betegnet i 1 prøve av 224 prøver

## Studie 2

I en reproducerbarhetsstudie (sted-til-sted) utført med en representativ analyse, inkluderte Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant-analysen et undersett av *CFTR* klinisk signifikante genetiske variasjoner analysert med MiSeq Reporter-programvaren ved hjelp av MiSeqDx-arbeidsprosessen for målrettet DNA-sekvensering (tabell 9). Den blindede studien brukte 3 prøvesteder og 2 operatører på hvert sted. To godt karakteriserte paneler på 46 prøver hver ble testet av hver operatør på hvert sted med totalt 810 betegnelser per sted. Panelene inneholdt en blanding av genomisk DNA fra cellelinjer med kjente varianter i *CFTR*-genet, i tillegg til leukocyt-utarmet blod tilsatt cellelinjer med kjente varianter i *CFTR*-genet. Blodprøvene ble gitt for å tilrettelegge inkorporering av ekstraksjonstrinnene som ble brukt til å forberede gDNA som fungerer som primærinnang for analysearbeidsflyten. Prøvegjennomgangsfrekvensen, definert som antallet prøver som går gjennom QC-metrikken på første forsøk, var 99,88 %. Alle testresultater er basert på innledende testing.

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

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

Pa- nel	Prøvenum- mer	Prøvegenotype	Varian-ter	Totale betegne- lser per sted	Positive samsvarsbetegnelser (varianter)			Negative samsvarsbetegnelser (villtype)			Antall feil betegne- lser	Antall ingen betegne- lser	Posit- ivt sams- var (%)	Negat- ivt sams- var (%)	Gener- elt samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C ikke tilstede	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100



Pa- nel	Prøvenum- mer	Prøvegenotype	Varian-ter	Totale betegne- lser per sted	Positive samsvarsbetegnelser (varianter)			Negative samsvarsbetegnelser (villtype)			Antall feil betegne- lser	Antall ingen betegne- lser	Positiv sams- var (%)	Negativ sams- var (%)	Gener- elt samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
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	N/A	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Pa- nel	Prøvenum- mer	Prøvegenotype	Varian-ter	Totale betegne- lser per sted	Positive samsvarsbetegnelser (varianter)			Negative samsvarsbetegnelser (villtype)			Antall feil betegne- lser	Antall ingen betegne- lser	Posit- ivt sams- var (%)	Negat- ivt sams- var (%)	Gener- elt samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delITT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100

Panel	Prøvenummer	Prøvegenotype	Varianter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarsbetegnelser (varianter)			Negative samsvarsbetegnelser (villtype)			Antall feil betegnelser	Antall ingen betegnelser	Positiv samsvar (%)	Negativ samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
B	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	59	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 <sup>4</sup>	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Prøvenummer	Prøvegenotype	Varian-ter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarsbetegnelser (varianter)			Negative samsvarsbetegnelser (villtype)			Antall feil betegnelser	Antall ingen betegnelser	Positiv samsvar (%)	Negativ samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
B	75 <sup>2</sup>	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 <sup>4</sup>	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Prøvenummer	Prøvegenotype	Variant-er	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarsbetegnelser (varianter)			Negative samsvarsbetegnelser (villtype)			Antall feil betegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
B	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
Total				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

<sup>1</sup> Villtypeplasseringen som tilsvarer N1303K-varianten for ett replikat, resulterte i en Ingen betegnelse på grunn av utilstrekkelig dekning.

<sup>2</sup> Ett replikat av prøvene 5 og 75 hadde 0 % betegnelsesfrekvens. Ytterligere undersøkelse angir at prøvene kanskje ikke har vært tilsatt prøveplaten før klargjøringen av biblioteket, fordi de gjenværende prøvevolumene i rørene var i samsvar med ingen volum som var fjernet.

<sup>3</sup> Bevis angir at prøvene 9 og 10 sannsynligvis ble byttet om av operatøren før biblioteket var klargjort.

<sup>4</sup> Villtypeplasseringen som tilsvarer M1V-varianten for ett replikat av hver av to prøver, resulterte i ingen betegnelse på grunn av utilstrekkelig dekning.

### Karakteristika for somatisk ytelse

Studier beskrevet her brukte Somatic Variant-modulen til å analysere sekvenseringsdata, bortsett fra de studiene som brukte panelet med 2 gener, der det ble brukt en analysespesifikk modul.

### Nøyaktighet

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

## Studie 1

Studien brukte en representativ analyse designet for å undersøke et bredt utvalg av gener som dekker 12 588 baser over 23 ulike kromosomer ved hjelp av 150 amplikoner. Y-kromosomet inneholder ikke konfidensregioner og ble ikke evaluert. De fem unike prøvene som ble brukt i denne studien var fra én enkelt familie – to foreldre og tre barn – som ofte sekvenseres av ulike laboratorier og med ulike sekvenseringsmetoder. Det foreligger tre prøver fra kvinner og to fra menn. Alle prøvene ble formalinfiksert og parafininnstøpt før DNA ble ekstrahert for studien. Prøve GM12877 ble fortynnet, på DNA-nivået, med prøve GM12878 for å opprette GM12877-D og således lage et sett med varianter med frekvenser nær 5 % og 10 %. Hver av prøvene ble testet i duplikat bortsett fra GM12877-D, som ble testet med fem replikater. Nøyaktigheten ble fastslått for SNV-er, innsetninger og slettinger ved å sammenligne studiedata med en godt karakterisert referansedatabase. Referansedatabase-sekvensen (Platinum Genomes versjon 2016-01) ble avledet av kombinasjonen av flere sekvenseringsmetoder, offentlig tilgjengelige data og arvelighetsinformasjon. Genomiske konfidensregioner ble definert basert på denne referansemetoden med mindre annet er angitt. Totalt ble prøvene kjørt åtte ganger. Tabellene nedenfor viser nøyaktighet basert på data fra den første kjøringen.

Tabell 10 inneholder studiedata som viser positivt og negativt prosentsvarende på en per prøve-basis, der variantresultatene er sammenlignet med den godt karakteriserte sammensatte referansemetoden for PPA-beregninger. De tre varianttypene (SNV-er, innsetninger og slettinger) er kombinert. Fordi referansemetoden kun gir resultater for de enkle nukleotidvariantene og innsetninger/slettinger, er ikke-variantbaserte resultatene sammenlignet med referansesekvensen for humant genom, bygg hg19, for NPA-beregninger.

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

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

<sup>1</sup> Varianter med frekvens større enn 20 %.

<sup>2</sup> Varianter med frekvens mindre enn 20 %.

De 150 ampliconene var designet for å dekke et bredt utvalg av genomisk innhold. GC-innholdet i ampliconene varierte fra 26–87 %. Ampliconer hadde også et utvalg av enkle nukleotid- (f.eks. PolyA, PolyT), dinukleotid- og trinukleotidgjentakelser. 6 unike prøver ble brukt i analysen. Data ble kompilert på en per amplicon-basis (tabell 11) for å bestemme virkningen av genomisk innhold på % riktige betegnelser. % riktige betegnelser består av variant- og referansebetegnelser og er mindre enn 100 % hvis det forekommer enten feil eller ingen betegnelser. Ingen betegnelser forekommer når ett eller flere filtre ikke oppfyller krav til variantbetegnelse (f.eks. utilstrekkelig dekning). Det var ingen uriktige betegnelser. Antall ingen betegnelser varierte betraktelig på tvers av ampliconene. GC-innhold og flere interaksjoner med GC-innhold var de mest signifikante prediktorene for ingen betegnelser. 2040/2580 (79 %) av ingen betegnelser skyldtes at de ikke oppfylte dekningsspesifikasjonen. Ampliconer med GC-innhold større enn 78 % resulterte i de fleste ingen betegnelser. Et representativt amplicon med 78 % GC-innhold hadde totalt 675 ingen betegnelser. Et representativt amplicon med 87 % hadde totalt 1365 ingen betegnelser. Dekning kan økes ved å redusere antall prøver som lastes inn i strømningcellen, noe som muliggjør deteksjon på ampliconer med høyt GC-innhold.

Tabell 11 Nøyaktighetsdata for PCR-produktnivå

Amplikon	Kromosom	Amplicons-tart	Amplicons-lutt	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensregioner	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	Totalt antall riktige betegnelser	Totalt antall uriktige betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	% riktige betegnelser
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	1380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1215	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	1350	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	N/A	0,65	1215	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1117	0	10	99,1
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	1320	0	0	100



13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	1365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	N/A	0,43	1395	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1095	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	N/A	0,43	1245	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1050	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	1305	0	30	97,8
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1108	0	2	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1170	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	1455	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	N/A	0,29	1169	0	1	99,9
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	930	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1035	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	920	0	10	98,9
28	5	1882081	1882158	78	75	N/A	0,78	450	0	675	40,0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	1260	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	N/A	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1245	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1005	0	0	100

33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	1365	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1125	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	1530	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	1380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	1383	0	27	98,1
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	1455	0	15	99,0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	1425	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	1290	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	1410	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	1365	0	0	100
43	7	22202176	22202148	73	73	N/A	0,44	1095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	1320	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	1299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	1275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	1350	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	1365	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	N/A	0,31	990	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	1395	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	N/A	0,42	1245	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	1305	0	30	97,8

53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1005	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	1470	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	N/A	0,49	1440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	1455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1170	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	0	0	1365	0
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1185	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	1350	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	1425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	N/A	0,49	1200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	N/A	0,51	1215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	N/A	0,45	1440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	N/A	0,65	1500	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	930	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	N/A	0,59	1530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	N/A	0,42	1275	0	0	100

74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	1365	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	1275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	0,34	1275	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	1275	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	1260	0	14	98,9
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	1395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	N/A	0,49	1215	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1065	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	1425	0	0	100
83	12	24167504	24167576	73	73	N/A	0,52	1095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	1335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1155	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	1005	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	N/A	0,25	1245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1215	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	1365	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	975	0	60	94,2
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	1410	0	0	100

94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	1440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	1395	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	1425	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	N/A	0,36	1365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1050	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	N/A	0,27	945	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	1425	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	1305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	1560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	1362	0	3	99,8
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	1335	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	1303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	1365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	1395	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	1335	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1215	0	78	94,0
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	1365	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	1365	0	15	98,9

114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	1289	0	1	99,9
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	1260	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1005	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	N/A	0,37	1365	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	1275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	N/A	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	N/A	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	N/A	0,68	1110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	N/A	0,64	1050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	N/A	0,61	1410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1230	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	1050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	1515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1005	0	6	99,4
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	1320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	1305	0	0	100

135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	990	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	1470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	1305	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	1029	0	7	99,3
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	1350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	N/A	0,68	1455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	1455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	N/A	0,6	1485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	1380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1035	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	N/A	0,52	1065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	N/A	0,55	0	0	0	N/A
149	Y	2655519	2655609	91	0	N/A	0,48	0	0	0	N/A
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	N/A

Varianter som var ingen betegnelser, er oppsummert i tabell 12. De aktuelle filtrere som resulterte i ingen betegnelser, er oppført i tabellen.

**Tabell 12** Oppsummering av ingen betegnelser-varianter

Amplikonnr.	Kr:Pos	Variant	Tilsvarende amplikoninnhold	Filter	Utelatte varianter	Forventede varianter
28	5:1882129	T>G	78 % GC	LowDP <sup>1</sup>	13	
52	8:24811064	AG > A	PolyG (7), CTC(4), 61 % GC	R3x6 <sup>2</sup>	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

<sup>1</sup> LowDP: Lav dekning. En variant filtreres hvis dybden i minst én av sammenslåingene ved denne bestemte posisjonen er under 900.

<sup>2</sup> R3x6: Gjentakelsesfilter. En variant filtreres hvis hele eller deler av varianten er til stede gjentatte ganger i referansegnetomet ved siden av variantposisjonen. Minst seks gjentakelser i referansen er nødvendig, og bare gjentakelser med lengde på opptil 3 bp vurderes.



Sekvenseringsresultatene for prøve ble sammenlignet med en genotype med høy konfidens for NA12878, etablert av National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Av de 150 ampliconene var 92 ampliconer helt innenfor de genomiske regionene med høy konfidens, 41 ampliconer hadde delvis overlapping og 17 ampliconer hadde ingen overlapping i NIST-sekvensen. Dette resulterte i 10 000 koordinater per replikat for sammenligning. Ikke-variantbasebetegnelser ble sammenlignet med referansesekvensen for humant genom, bygg hg19. Nøyaktighetsresultatene vises i tabell 13.

**Tabell 13** Samsvar av MiSeqDx-instrumentets basebetegnelseresultater og NIST-referanse for GM12878-prøve

Prøve	Antall ampliconer	Gj.snittlig betegnelsesfrekvens	Totalt antall TP-variantbetegnelser	Totalt antall FN-variantbetegnelser	Totalt antall TN-betegnelser	Totalt antall FP-betegnelser	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19231	0	100	100	100

De fem uforynnede prøvene ble videre analysert for å betegne små innsetninger og slettinger (indeler) (tabell 14). I noen tilfeller var indelen vanlig blant to eller flere prøver, som vist i kolonnen «Totalt antall prøvereplikater med indel». Resultatene for begge replikater av de fem prøvene er inkludert i tabell 14. Det var totalt 71 indeler, som varierte i størrelse fra 1–24 bp for innsetninger og 1–25 bp for slettinger. 68 indeler ble alle detektert med et positivt prosentamsvar på 1. Tre innsetninger og slettinger hadde ingen riktige betegnelser fordi hver av disse variantene var en ingen betegnelse på grunn av R3x6-filteret. PPA, som ekskluderer ingen betegnelser, kunne derfor ikke beregnes. De tre variantene var 1 bp sletting (kr8 24811064 AG>A); 2 bp sletting (kr10 55892600 TAC>T) og 1 bp innsetting (kr17 39589692 C>CA).

Tabell 14 Oppsummering av indeldeteksjon med MiSeqDx-instrumentet

Amplikon	Kromosom	Posi-sjon	Analysert fragmentstørrelse	Amplikonindeltype og -lengde	Indel	Totalt antall prøvereplikater med indel	Antall ingen betegnelser	Totalt antall uriktige indelbetegnelser	Totalt antall riktige indelbetegnelser	PPA
1	1	36450544	93	25 bp sletting	GAAAATTTAATGAAACACATTGCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	3 bp sletting	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	23 bp innsetting	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	17 bp sletting	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	5 bp innsetting	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	3 bp innsetting	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	7 bp innsetting	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	6 bp sletting	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	5 bp innsetting	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	12 bp innsetting	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	2 bp innsetting	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	23 bp sletting	TAACTTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	9 bp innsetting	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100

21	3	190106071	75	1 bp sletting	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	8 bp sletting	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	11 bp innsetting	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	4 bp sletting	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	8 bp innsetting	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	21 bp sletting	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	3 bp sletting	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	25 bp sletting	CTTTCAC TTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	23 bp sletting	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	1 bp innsetting	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	4 bp sletting	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	1 bp innsetting	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	4 bp sletting	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	11 bp sletting	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	1 bp sletting	AG>A	15	15	0	0	N/A
53	8	76518677	67	4 bp innsetting	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	4 bp innsetting	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	21 bp sletting	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	3 bp sletting	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	16 bp sletting	AGCGTCTATAACCAAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	2 bp sletting	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	2 bp innsetting	C>CTG	7	0	0	7	100

70	11	59837721	62	8 bp innsetting	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	8 bp sletting	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	2 bp sletting	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	21 bp innsetting	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	19 bp innsetting	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	4 bp innsetting	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	20 bp sletting	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	22 bp sletting	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	4 bp innsetting	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	16 bp sletting	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	5 bp sletting	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	6 bp sletting	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	25 bp sletting	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	3 bp innsetting	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	4 bp innsetting	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	7 bp sletting	ATTATTT>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	1 bp sletting	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	18 bp innsetting	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	4 bp innsetting	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	84	1 bp innsetting	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	24 bp innsetting	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	4 bp sletting	CAGTG>C	7	0	0	7	100

114	17	61502459	79	12 bp sletting	TTTGTATCTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	22 bp innsetting	T>TGTATCTTAGCAAAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	3 bp innsetting	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	2 bp sletting	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	15 bp sletting	TACTTGAGAACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	5 bp innsetting	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	11 bp innsetting	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	16 bp sletting	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30300873	66	11 bp innsetting	G>GATAAAACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	21 bp sletting	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	5 bp sletting	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	6 bp innsetting	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	5 bp innsetting	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	10 bp sletting	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

## Studie 2

Denne studien brukte lagrede FFPE-prøver av kolorektalt kreftvev og en representativ analyse med to gener som ble sammenlignet med referansemotoden, toveis Sanger-sekvensering (Sanger). Av de totalt 1183 individene hadde 441 individer gyldige resultater med Sanger og den representative analysen. Ved evaluering på individnivå (tabell 15) var 230 av de 441 individene positive med Sanger (mutasjon detektert med Sanger). Av disse var 227 positive med den representative analysen. De resterende 211 av de 441 individene var negative med Sanger (ingen mutasjon detektert med Sanger). Av disse var 206 negative med den representative analysen. Dette resulterte i et positivt prosentsamsvar (PPA) på 98,7 % og et negativt prosentsamsvar (NPA) på 97,6 % (tabell 15).

**Tabell 15** Positivt og negativt prosentamsvar for resultater på individnivå

Representativ analyse	Sanger		Total
	Positiv	Negativ	
Positiv	227 <sup>1</sup>	5	232
Negativ	3 <sup>2</sup>	206	209
Total	230	211	441

#### Oppsummering av ytelse

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

<sup>1</sup>Det var 224 nøyaktige matcher for resultater innenfor individer og på alle mutasjonsnivåer. For 2 individer detekterte MiSeqDx den Sanger-detekterte mutasjonen og 1 ekstra mutasjon. For 1 individ detekterte MiSeqDx og Sanger forskjellige mutasjoner.

<sup>2</sup>Ett individ hadde 2 mutasjoner detektert med Sanger; 2 individer hadde én mutasjon detektert med Sanger.

### Studie 3

Denne studien vurderte DNA-biblioteker klargjort med FFPE-prøver på tvers av flere vevstyper. Totalt 109 FFPE -prøver fra åtte ulike vev (tykktarm, eggstokk, bukspyttkjertel, binyre, blære, lever, skjoldbruskkjertel og bryst), der minst 11 FFPE -prøver representerte hver vevstype. Binyrevevet inkluderte metastase fra spiserør, lunge, tykktarmstumor, det andre vevet hadde primære tumorer. Denne studien brukte en representativ analysedesign for å undersøke 26 gener som dekker 21 577 baser over 17 forskjellige kromosomer. Totalt 6 forskjellige gener (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* og *BRAF*) ble Sanger-sekvensert, der hver tumor som hadde 1–3 gener ble Sanger-sekvensert basert på forventet prevalens av somatiske mutasjoner for denne tumoren. Sanger-sekvenseringsresultater identifiserte 39 SNV-somatiske mutasjoner i 33 av 109 FFPE -prøver. MiSeqDx identifiserte 36 SNV-somatiske mutasjoner i 32 av 109 FFPE -prøver med 1 falskt negativ og 2 ingen betegnelser-variantposisjoner. PPA var 97,3 %. MiSeqDx identifiserte 78 975 referansebasen for de 109 FFPE-prøvene med 29 falskt positive sammenlignet med Sanger-sekvensering og 2437 ingen betegnelser. NPA var 99,9 %. En to-basesletting samsvarte mellom de to metodene. Tabell 16 oppsummerer resultatene etter vevstype.

Tabell 16 Positivt og negativt prosentamsvar etter vevstype

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

### Reproduserbarhet

To studier ble utført for å vurdere reproduserbarheten til MiSeqDx-instrumentet med DNA ekstrahert fra FFPE -prøver. Studie 1 brukte flere instrumenter, studie 2 hadde flere analysesteder.

#### Studie 1

Reproduserbarheten til MiSeqDx-instrumentet ble bestemt ved hjelp av to instrumenter og to erfarne operatører i totalt åtte kjøring. Den representative analysen, det genomiske innholdet i amplikon, prøvene og referansemetoden er de samme som beskrevet for nøyaktighetsstudie 1 ovenfor. Resultatene vises på en per amplikon-basis for hvert instrument (tabell 17) for å vise reproduserbarhet for betegnelse på tvers av instrumenter. % riktige betegnelser inkluderte både uriktige og ingen betegnelser (ett eller flere filtre oppfyller ikke krav til variantbetegnelse). Instrumentene genererte lignende antall ingen betegnelser avhengig av det bestemte amplikonet. En enkelt uriktig betegnelse i en konfidensregion, slik det defineres av Platinum Genomes-referansestandard, ble observert for MiSeqDx 1. Den uriktige betegnelsen var en falskt positiv betegnelse for en innsetningsvariant i det undersøkte kromosomet 10 i amplikon 64 ved posisjonene 55892599 til 55892687. Amplikonet hadde en dinukleotidgjentakelse på 11.

Tabell 17 Resultater fra instrument-til-instrument-reproduserbarhetsstudie for MiSeqDx-instrumentet (PCR-produktnivå)

Amplikon	Kromosom	Analysert fragmentstørrelse	Baser i konfidensregioner	Genomisk innhold i PCR-produkt	GC-innhold	M70215			M70217		
						Totalt riktige betegnelser	Totalt uriktige betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser	Totalt riktige betegnelser	Totalt uriktige betegnelser	Totalt antall ingen betegnelser
1	1	93	93	Indel	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Indel	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Indel	0,49	5518	0	2	5518	0	2
5	1	81	81	PolyG (5)	0,69	4858	0	2	4860	0	0
6	1	70	70	PolyT (10), indel	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Indel	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Indel	0,38	4800	0	0	4800	0	0
10	2	85	81	N/A	0,65	4859	0	1	4859	0	1
11	2	75	75	PolyA (8)	0,35	4468	0	40	4468	0	40
12	2	88	88	PolyT (5)	0,42	5280	0	0	5280	0	0
13	2	87	87	PolyT (5), indel	0,31	5211	0	43	5214	0	40
14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	5453	0	7	5449	0	11



15	2	93	93	N/A	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	PolyT (5), indel	0,42	4378	0	2	4379	0	1
17	3	93	93	AT(3), indel	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	N/A	0,43	4980	0	0	4980	0	0
19	3	70	70	CT(3), indel	0,49	4193	0	7	4194	0	6
20	3	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	5220	0	120	5220	0	120
21	3	75	74	Indel	0,57	4432	0	8	4432	0	8
22	4	78	78	PolyA (6)	0,26	4676	0	4	4676	0	4
23	4	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	5820	0	0	5820	0	0
24	4	78	78	N/A	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	PolyA (5), indel	0,36	3720	0	0	3720	0	0
26	4	71	69	PolyA (5)	0,46	4140	0	0	4140	0	0
27	4	62	62	PolyA (7), indel	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	N/A	0,78	3368	0	1132	3485	0	1015
29	5	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	5040	0	0	5040	0	0
30	5	64	64	N/A	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	PolyA (6), indel	0,3	4979	0	1	4980	0	0
32	5	67	67	PolyT (5)	0,37	4020	0	0	4020	0	0
33	5	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	5460	0	0	5460	0	0

34	5	75	75	Indel	0,43	4498	0	6	4500	0	1
35	6	102	102	PolyG (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0
36	6	92	92	Indel	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), indel	0,61	5532	0	108	5532	0	108
38	6	98	98	Poly T (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60
39	6	95	95	Indel	0,53	5697	0	3	5698	0	2
40	6	86	86	PolyC (6)	0,7	5159	0	1	5160	0	0
41	6	95	94	PolyG (5), indel	0,61	5638	0	2	5638	0	2
42	6	91	91	PolyA (5)	0,44	5460	0	0	5460	0	0
43	7	73	73	N/A	0,44	4380	0	0	4380	0	0
44	7	88	88	Indel	0,35	5279	0	1	5276	0	4
45	7	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	5184	0	36	5181	0	39
46	7	85	85	Indel	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	PolyG (5), indel	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	5460	0	0	5459	0	1
49	7	81	66	N/A	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	Indel	0,35	5580	0	0	5579	0	1
51	8	83	83	N/A	0,42	4980	0	0	4980	0	0
52	8	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Indel	0,3	4020	0	0	4020	0	0

54	9	98	98	PolyG (6)	0,67	5879	0	1	5880	0	0
55	9	65	65	Indel	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	N/A	0,49	5760	0	0	5760	0	0
57	9	83	83	AT(3)	0,37	4973	0	7	4978	0	2
58	9	97	97	PolyC (6), indel	0,68	5817	0	3	5818	0	2
59	10	79	78	PolyG (5), indel	0,47	4679	0	1	4680	0	0
60	10	98	91	GC(3)	0,87	450	0	5010	632	0	4828
61	10	79	79	PolyT (5)	0,3	4740	0	0	4740	0	0
62	10	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	5400	0	0	5400	0	0
63	10	95	95	Indel	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	AC(11), indel	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	N/A	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	N/A	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	N/A	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	Indel	0,46	4199	0	2	4200	0	1
69	11	100	100	N/A	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	Indel	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	N/A	0,59	6120	0	0	6118	0	2
72	11	73	73	PolyA (5)	0,4	4380	0	0	4380	0	0
73	11	85	85	N/A	0,42	5100	0	0	5100	0	0
74	11	91	91	PolyG (6)	0,55	5437	0	23	5441	0	19

75	11	85	85	Indel	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	Poly A (5), CA (3), indel	0,34	5100	0	0	5100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5100	0	0	5100	0	0
78	12	84	84	PolyC (5), indel	0,52	5040	0	60	5038	0	63
79	12	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	5577	0	3	5573	0	7
80	12	81	81		0,49	4860	0	0	4860	0	0
81	12	71	71	PolyA (6)	0,35	4260	0	0	4260	0	0
82	12	95	95	PolyG (5)	0,68	5605	0	95	5605	0	95
83	13	73	73	N/A	0,52	4380	0	0	4379	0	1
84	13	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Indel	0,49	5340	0	0	5340	0	0
86	13	77	77	Indel	0,39	4620	0	0	4620	0	0
87	14	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	4020	0	0	4020	0	0
88	14	83	83	N/A	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	PolyT (5), indel	0,19	4173	0	147	4173	0	147
90	14	81	81	Indel	0,38	4860	0	2	4860	0	0
91	14	91	91	Indel	0,35	5459	0	1	5460	0	0
92	14	66	66	PolyA (5)	0,41	3900	0	240	3900	0	240
93	14	94	94	Indel	0,62	5637	0	3	5637	0	3
94	15	98	96	PolyC (5)	0,45	5760	0	0	5760	0	0

95	15	68	68	Indel	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	PolyG (5), indel	0,68	5475	0	105	5487	0	93
97	15	95	95	PolyT (6)	0,43	5699	0	1	5700	0	0
98	15	72	71	Indel	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	N/A	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Indel	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	N/A	0,27	3780	0	0	3780	0	0
102	16	95	95	PolyC (5)	0,67	5700	0	0	5700	0	0
103	16	87	87	TA(3)	0,41	5220	0	0	5220	0	0
104	16	104	104	PolyC (5)	0,67	6238	0	3	6238	0	3
105	16	91	91	PolyT (5), indel	0,37	5443	0	17	5444	0	16
106	17	89	89	GC(3)	0,64	5251	0	89	5339	0	1
107	17	87	87	PolyC (5), indel	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	Indel	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Indel	0,26	5580	0	0	5580	0	0
110	17	91	89	PolyT (5)	0,54	5340	0	0	5340	0	0
111	17	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	4860	0	308	4860	0	307
112	17	91	91	PolyA (5)	0,34	5459	0	1	5459	0	1
113	17	92	92	PolyA (7), AT (3), AT(4), AT (4), indel	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	Indel	0,41	4699	0	41	4700	0	40

115	17	86	86	PolyT (7)	0,22	5153	0	7	5156	0	4
116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5039	0	1	5039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4020	0	0	4020	0	0
118	18	91	91	N/A	0,37	5460	0	0	5460	0	0
119	18	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9
120	18	75	75	PolyA (5), indel	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	CTC(3), indel	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	CT(3), indel	0,45	5098	0	2	5098	0	2
123	18	65	65	N/A	0,48	3900	0	0	3900	0	0
124	19	99	99	N/A	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	N/A	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	N/A	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	N/A	0,61	5640	0	1	5638	0	3
128	20	82	82	AC(3)	0,59	4920	0	0	4920	0	0
129	20	76	76	CT(3)	0,58	4559	0	1	4558	0	2
130	20	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	4200	0	0	4200	0	0
131	20	101	101	Indel	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	Indel	0,36	4020	0	31	4020	0	25
133	20	91	88	PolyG (6)	0,73	5277	0	3	5274	0	6
134	20	87	87	Indel	0,57	5218	0	2	5218	0	2
135	21	66	66	Indel	0,35	3959	0	1	3957	0	3

136	21	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	5880	0	0	5880	0	0
137	21	87	87	GT(3), indel	0,39	5220	0	0	5220	0	0
138	21	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	4119	0	31	4113	0	37
139	21	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	5399	0	1	5399	0	1
140	22	100	100	Indel	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	N/A	0,68	5819	0	1	5819	0	1
142	22	97	97	Indel	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	N/A	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	Indel	0,66	5519	0	1	5519	0	1
145	X	69	69	PolyT (5)	0,26	4139	0	1	4140	0	0
146	X	69	69	PolyC (5)	0,62	4136	0	4	4137	0	3
147	X	71	71	N/A	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	Y	65	0	N/A	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	N/A	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Resultatene fra reproduserbarhetsstudien ble analysert på en per operatør-basis ved hjelp av variantfrekvens (tabell 18). Denne analysen viste at variantfrekvenser var konsekvente for alle operatører. Gjennomsnittlige variantfrekvenser +/- 1 standardavvik vises nedenfor.

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

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



Resultatene fra reproduserbarhetsstudien for hver prøve vises sammensatt for alle ni kjøringene (tabell 19). Deteksjon evalueres separat for hver varianttype – SNV-er, innsetninger og slettinger. Referanseposisjoner er ekskludert. Denne analysen viste at resultatene for variantene var reproduserbare på tvers av prøvene.

Tabell 19 Samsvar av MiSeqDx-instrumentets basebetegnelsesresultater per prøve

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

<sup>1</sup> Varianter med frekvens større enn 20 %.

<sup>2</sup> Varianter med frekvens mindre enn 20 %.

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

- GC-innhold  $\geq 19$  % (alle betegnede baser i 120 av 120 sekvenserte amplikoner med 19 % GC-innhold ble riktig betegnet med ingen betegnelse-frekvens på 3,4 %)
- GC-innhold  $\leq 73$  % (alle betegnede baser i 120 av 120 sekvenserte amplikoner med 73 % GC-innhold ble riktig betegnet med ingen betegnelse-frekvens på 0,1 %)
- PolyA-lengder  $\leq 8$  (PolyA-gjentakelse av 8 nukleotider ble riktig betegnet i 120 av 120 sekvenserte amplikoner som inneholdt PolyA = 8)
- PolyT-lengder  $\leq 10$  (PolyT-gjentakelse av 10 nukleotider ble riktig betegnet i 120 av 120 sekvenserte amplikoner som inneholdt PolyT = 10)
- PolyG-lengder  $\leq 6$  (PolyG-gjentakelse av 6 nukleotider ble riktig betegnet i 720 av 720 sekvenserte amplikoner som inneholdt PolyG = 6)
- PolyC-lengder  $\leq 6$  (PolyC-gjentakelse av 6 nukleotider ble riktig betegnet i 359 av 360 sekvenserte amplikoner som inneholdt PolyC = 6, med 1 ingen betegnelse)
- Dinukleotidgjentakelseslengder  $\leq 4x$  (alle betegnede baser i 600 av 600 sekvenserte amplikoner med 4x dinukleotidgjentakelse ble riktig betegnet med ingen betegnelse-frekvens på 0,4 %)

- Trinukleotidgjentakelseslengder  $\leq 5x$  (alle betegnede baser i 120 av 120 sekvenserte amplikoner med 5x trinukleotidgentakelse ble riktig betegnet med ingen betegnelse-frekvens på 1,9 %)
- 24 eller færre baseinnsetninger og 25 eller færre baseslettinger
  - 24-baseinnsetninger ble riktig betegnet i 120 av 120 prøver
  - 25-baseslettinger ble riktig betegnet i 182 prøver og rapportert som ingen betegnelse i 2 prøver av 184 prøver

## Studie 2

En ekstern studie ble utført for å vurdere reproduserbarheten til den representative analysen med 2 gener, beskrevet i nøyaktighetsstudie 2, på 3 eksterne teststeder (2 operatører per sted), med 1 reagenslot og på 3 ikke-etterfølgende testdager. Testing ble gjennomført med 6 godt karakteriserte prøvepaneler med genomiske DNA-prøver fra kliniske FFPE-prøver eller cellelinjer. Hvert panel besto av 10 prøver, med totalt 60 prøver for alle panelene.

De 60 panelprøvene besto av duplikater av 4 unike villtypeprøver (for panelmutasjoner), 12 unike mutantprøver (med en enkelt mutasjon) som var klargjort med både høyt og lavt mutasjonsfrekvensnivå, og 2 unike mutantprøver (med en enkelt mutasjon) som var klargjort kun med et lavt mutasjonsfrekvensnivå. Hver unike prøve/mutasjonsfrekvensnivåprøve (testet i duplikat i hver kjøring) hadde 36 mulige resultater (2 replikater  $\times$  2 operatører  $\times$  3 dager  $\times$  3 steder) hvis alle resultatene var gyldige.

Prosentandel forventet betegnelse (PEC) for alle positive og negative varianter ble evaluert ved å sammenligne det representative analyseresultatet med det forventede mutasjonsresultatet (forventet mutasjon detektert eller ikke detektert) i hver prøve. PEC beregnes som 100 % ganger antallet forventede betegnelser dividert med antall betegnelser som er forsøkt. Det tosidige 95 %-konfidensintervallet beregnes ved hjelp av Wilson-scoremetoden.

For alle stedene var prøvegjennomgangsfrekvensen  $\geq 94,7$  % for den første kjøringen av prøven eller for prøver som ble testet i kjøring som var gyldige ved første gjennomgang. Mutasjonsnivå-PEC for alle mutantprøver var 99,6 % (905/909) (95 % CI; 98,9, 99,8). Antall forsøkte betegnelser over alle 56 panelmutasjoner (uavhengig av om en detektert mutasjon var forventet eller ikke) for alle gyldige prøver var 58 856 (56  $\times$  1051). Av disse 58 856 mutasjonsnivå-observasjonene var det bare 6 tilfeller der det observerte og forventede resultatet ikke stemte overens. Mutasjonsnivå-PEC for alle positive og negative varianter fra alle mutant- og villtypepanelprøver kombinert var 99,99 % (58 850/58 856).

### Analytisk sensitivitet (blankgrense (LoB) og deteksjonsgrense (LoD))

Denne studien verifiserte analysens cut-off og bestemte deteksjonsgrensen (LoD) for MiSeqDx med et representativt panel. Kort oppsummert ble de godt karakteriserte Platinum Genome-cellelinjene GM12878 og GM12877 formalinfisert og innstøpt i parafin før DNA ble ekstrahert. GM12878 ble fortynnet med GM12877 slik at variantfrekvensene til sytti varianter (52 SNV-er, ni innsetninger og ni slettinger) var nær 0,05. De to DNA-prøvene ble testet av to operatører med to instrumenter og to reagensloter i totalt 10 MiSeqDx-sekvenseringskjøringer. Dette resulterte i 40 replikater for hver variant i GM12878, og 60 replikater for hver tilsvarende villtype-koordinat i GM12877 for hver reagenslot. LoB og LoD ble beregnet ved hjelp av den klassiske metoden angitt i CLSI EP17-A2 ved bruk av det ikke-parametriske alternativet. LoB og LoD ble beregnet for SNV-er, innsetninger og slettinger separat ved å slå sammen variantfrekvensene for en gitt varianttype. Type I-feil ble definert som 0,01, og type II-feil ble definert som 0,05.

For LoB ble de sammenslåtte variantfrekvensene sortert fra lavest til høyest, og den 99. posisjonen for hver reagenslot for hver varianttype ble beregnet (tabell 20). MiSeqDx-programvaren bruker en cut-off (den effektive LoB) på 0,026 variantfrekvens til å bestemme den kvalitative deteksjonen av varianter. De beregnede blankgrensene verifiserte at denne cut-off resulterer i en type I-feil som ikke er større enn 0,01.

Tabell 20 Blankgrense

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

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

Tabell 21 Deteksjonsgrense

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

De følgende studiene viser ytelseskaraktistikker for MiSeqDx med en annen representativ analyse rettet mot 56 mutasjoner i to klinisk relevante kreftgener (mutasjonspanel). Mutasjonspanelet er designet for spesifikt å detektere 56 mutasjoner i to klinisk relevante kreftgener (gen 1 og gen 2). Analysen bestemmer samtidig tilstedeværelsen eller fraværet av hver av de 56 mutasjonene i hver sekvensert prøve. Referansemotoden for disse studiene var toveis Sanger-sekvensering.

## Lot-til-lot-presisjon

En lot-til-lot-presisjonsstudie ble utført for å evaluere ytelsen til MiSeqDx-instrumentet på tvers av produserte reagenssettloter (bestående av prøvekvalifiserings-, biblioteksklargjørings- og sekvenseringsreagenser) ved hjelp av den representative analysen med 2 gener og et panel av 5 blandede FFPE-prøver som oppfylte kravene til prøvekvalifisering. Hver FFPE-prøve inneholdt 2 unike mutasjoner: én ved et lavt (ca. 8 %) mutasjonsfrekvensnivå og én ved et høyt (ca. 14 %) mutasjonsfrekvensnivå. Tolv (12) observasjoner av hver av de 5 prøveblandinger ble samlet inn over tre ikke-etterfølgende dager med 3 reagenssettloter. Det totale antallet observasjoner i studien for alle reagensloter var 180 observasjoner for alle prøveblandinger og 360 observasjoner for alle mutasjonsfrekvensnivåer. På tvers av alle loter og dager viste 99,7 % (359/360) av observasjonene det forventede mutasjonsresultatet. Én lavfrekvensmutasjon ble feilaktig betegnet som villtype. En variasjonskomponentanalyse ble utført for hver av mutasjonene/mutasjonsfrekvensnivåene for å estimere systemets variasjon. Det totale standardavviket varierte fra 0,011 til 0,029. Reagenslotkomponenten i det totale standardavviket varierte fra 0 til 0,015.

## Patenter og varemerker

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

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

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

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

© 2021 Illumina, Inc. Med enerett.

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

## Kontaktinformasjon



Illumina

5200 Illumina Way

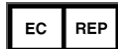
San Diego, California, 92122 USA

+1 800 809 ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (utenfor Nord-Amerika)

techsupport@illumina.com

[www.illumina.com](http://www.illumina.com)



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Nederland

Australsk sponsor:

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Australia

## Produktmerking

Ønsker du en fullstendig oversikt over symboler som finnes på produktemballasjen og -merkingen, kan du gå til [support.illumina.com](http://support.illumina.com) og lese under fanen *Documentation and Literature* (Dokumentasjon og litteratur) for settet.