

Pakningsvedlegg for TruSight Cystic Fibrosis

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK

Katalognr. 20036925: 1–4 kjøringer, opptil 96 prøver per sett

Produktoversikt

TruSight™ Cystic Fibrosis Library Prep er et bibliotekklargjøringssett som støtter TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay og TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay.

Tiltenkt bruk for TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay (tidligere kalt Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay) er et kvalitativt *in vitro*-diagnostisk system som brukes til samtidig å påvise 139 klinisk relevante mutasjoner som fremkaller cystisk fibrose, og varianter av CFTR-genet (cystisk fibrose transmembran ledeevneregulator) i genomisk DNA isolert fra prøver av humant perifert fullblod. Variantene omfatter de som ble anbefalt i 2004 av American College of Medical Genetics (ACMG)¹ og i 2011 av American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG).² Testen er beregnet på bærerundersøkelse hos voksne i reproduktiv alder, til bekreftende diagnostisk testing av nyfødte og barn, og som en innledende test for å bistå i diagnostiseringen av personer med mistenkt cystisk fibrose. Resultatene av denne testen er beregnet på å bli tolket av en godkjent klinisk molekylær genetiker eller tilsvarende, og skal brukes sammen med annen tilgjengelig laboratorieinformasjon og klinisk informasjon.

Denne testen er ikke indisert for bruk til nyfødtscreening, føtal diagnostikk, testing før innsetting av embryo eller eneste grunnlag for diagnostikk.

Testen er beregnet for bruk på Illumina MiSeqDx-instrumentet.

Tiltenkt bruk av TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay (tidligere kalt Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay) er et *in vitro*-diagnostisk system for målrettet sekvensering som resekvenserer proteinkodingsregionene og intron/ekson-grensene til CFTR-genet (cystisk fibrose transmembran ledeevneregulator) i genomisk DNA isolert fra prøver av humant perifert fullblod samlet inn i K₂EDTA. Testen påviser enkle nukleotidvarianter og små indeler i regionen som sekvenseres, og rapporterer i tillegg om to dype intronmutasjoner og to store delesjoner. Testen er beregnet for bruk på Illumina MiSeqDx-instrumentet.

Testen er beregnet for å brukes til å bistå i diagnostiseringen av personer med mistenkt cystisk fibrose (CF). Denne analysen er mest hensiktsmessig når pasienten viser atypisk eller ikke-klassisk CF, eller når andre mutasjonspaneler ikke har kunnet identifisere begge forårsakende mutasjoner. Testresultatene er beregnet på å bli tolket av en godkjent klinisk molekylær genetiker eller tilsvarende, og skal brukes sammen med annen tilgjengelig informasjon som omfatter kliniske symptomer, andre diagnostiske tester og familiehistorikk.

Denne testen er ikke indisert for bruk som eneste grunnlag for diagnostikk, føtal diagnostikk, for testing før innsetting av embryo, bærerundersøkelse, nyfødt- eller populasjonscreening.

Bakgrunn for cystisk fibrose

Klinisk beskrivelse

Cystisk fibrose (CF) er en av de vanligste genetiske lidelsene i den vestlige verden og den vanligste livstruende autosomale, recessive lidelsen i den ikke-latinamerikanske, hvite befolkningen.³⁻⁷ CF har innvirkning på viskositeten til slimutskillelser og påvirker epitelene i luftveiene, bukspyttkjertelen, tarmen, lever- og gallesystemet, mannlig genitalkanal og svettekjertlene, noe som resulterer i kompleks flerorgan- og flersystemlidelse⁴⁻⁶, der lungene er det primære organsystemet forbundet med morbiditet og mortalitet.⁸ I mange tilfeller varslers ernæringsmessig tilbakegang om progresjon av CF-lungesykdom. Et sentralt fokus for dagens intervensjonsinnsats er tidlig diagnostisering gjennom nyfødtscreening,⁷ for derved å muliggjøre betimelig tilgang til viktige medisinske tjenester og gi best mulig resultat for personer med lidelsen.^{4,7} Selv om det er kjønnsforskjeller i overlevelse, der median overlevelse rapporteres å være større for menn enn for kvinner, er median total overlevelse 38,3 år i USA.⁸

CFTR-varianter og insidens

CFTR-genet (cystisk fibrose transmembran ledeevneregulator), som ble identifisert i 1989, er plassert på den lange armen til kromosom 7, og inneholder 27 kodingeksoner fordelt over 230 kb.⁴ Et 6,5 kb mRNA produsert av den normale allelen koder CFTR, et integrert membranprotein på 1490-aminosyrer som fungerer som en regulert kloridkanal i epitelcellene til flere organer.^{4,5} Mer enn 1900 varianter av CFTR er så langt beskrevet, der de fleste er punktmutasjoner.⁹ Den vanligste CFTR-varianten er F508del-allelen,⁵ som står for nesten 70 % av alle CFTR-varianter.³ Imidlertid resulterer ofte andre vanlige CFTR-varianter i en CF-fenotype og andre CFTR-relaterte lidelser.³⁻⁵

Cystisk fibrose har en estimert sykdomsinsidens på én av 2000–4000 levendefødte barn og en utbredelse på ca. 30 000 personer i USAs populasjon.⁴ Det forekommer med forskjellig frekvens i populasjoner med forskjellig etnisitet og rase: én av 3000 kaukasiske, én av 9200 latinamerikanske, én av 10 900 indianere, én av 15 000 afrikansk amerikanske og én av 31 000 asiatisk amerikanske.^{4,6} Nåværende estimater for CFTR-mutasjonsbærerfrekvens etter etnisitet i USA, basert på en kohort med 364 890 personer henvist for bærertesting uten familiehistorikk med CF, er oppgitt i [Tabell 1](#).

Tabell 1 Generell mutasjonsbærefrekvens for cystisk fibrose i forskjellige etniske grupper i USA¹⁰

Etnisk gruppe	Observerte bærefrekvens
Afrikansk amerikansk	1 av 84
Ashkenazi-jødisk	1 av 29
Asiatisk	1 av 242
Kaukasisk	1 av 28
Latinamerikansk	1 av 59
Jødisk	1 av 32
Fra Midtøsten	1 av 91
Indianer	1 av 70
Sør-asiatisk	1 av 118
Annen etnisitet	1 av 111
Annen etnisitet: > 1 etnisitet	1 av 34
Annen etnisitet: delvis afrikansk amerikansk	1 av 56
Annen etnisitet: delvis kaukasisk	1 av 32
Annen etnisitet: delvis latinamerikansk	1 av 51
Ikke oppgitt	1 av 37
Alle personer	1 av 38

Oppsummering og forklaring av Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

Oversikt over CFTR2-prosjektet

CFTR2-prosjektet er et internasjonalt initiativ ledet av et team av forskere og klinikere, og støttes av et tilskudd fra National Institute of Health og amerikanske Cystic Fibrosis Foundation.^{11,12} CFTR2 er ment å gi omfattende og ekspertvurdert funksjonell og klinisk informasjon om CFTR-varianter. I et forsøk på klinisk å validere alle CF-varianter med allefrekvenser på 0,01 % og høyere, slo 25 CF-registre og klinikker fra hele verden¹³ sammen ressurser med mål om å samordne klinisk informasjon fra over 39 000 CF-pasienter med de nesten 1900 CF-variantene som hadde blitt registrert gjennom årene i CFTR1-databasen ved Hospital for Sick Children i Toronto.^{11,13} Kliniske egenskaper, som kloridkonsentrasjon i svette, lungefunksjon (predikert FEV1%) og bukspyttkjertelstatus ble analysert i tillegg til informasjon om CFTR-genotype. Den systematiske tilnærmingen til samtidig å analysere disse variantene fra kliniske, funksjonelle og genetiske perspektiver, ga 134 unike CF-fremkallende varianter i 129 unike genomiske posisjoner (ettersom det for fem posisjoner vises to nukleotidendringer i samme posisjon) oppført i CFTR2-databasen (fra august 2013). Bruk av et panel bestående av alle disse variantene forventes å utgjøre 95,4 % av cystisk fibrose-fremkallende alleler og øker identifiseringen av parene som er i fare, ved påvisning av begge alleler til ~91 % fra 72 % ved hjelp av ACMG-anbefalt panel med 23 varianter.

CFTR-varianter i panel

Variantene rapportert av Cystic Fibrosis 139-Variant Assay ble valgt spesifikt fordi de representerer hele settet med klinisk validerte varianter som er klassifisert som CF-fremkallende i CFTR2-databasen ved Johns Hopkins University, et produkt av CFTR2-initiativet (Clinical and Functional Translation of CFTR).

Analysen tester for: 134 CF-fremkallende varianter, én ACMG-anbefalt panelvariant (R117H, klassifisert som en mutasjon med varierende kliniske konsekvenser, MVCC, av CFTR2), én betinget rapportert modifierende variant (PolyTG/PolyT) og tre betinget rapporterte godartede varianter (I506V, I507V, F508C)¹⁴, noe som gir totalt 139 rapporterte varianter.

De 134 CF-fremkallende variantene samsvarer med 129 CF-fremkallende varianter i CFTR2-databasen. CFTR2-databasen omfatter fem CF-fremkallende varianter, og for hver av disse kan den samme endringen i proteinnivå skyldes to distinkte nukleotidendringer [f.eks. S466X(C>A) og S466X(C>G)]. Disse fem variantene er oppført etter aminosyrekodonet i CFTR2-databasen (f.eks. S466X), mens analysen rapporterer hver enkelt variant [f.eks. S466X(C>A) og S466X(C>G)]. Listen over 139 varianter rapportert av Cystic Fibrosis 139-Variant Assay er oppgitt i **Tabell 2**. Fet skrift=ACMG-23, kursiv=betinget rapportert.

Tabell 2 Oversikt over Cystic Fibrosis 139-Variant Assay-varianter

[Varianter er oppført etter genomisk koordinat. Den tilhørende endringen i nukleotidnivå for hvert nivå står i parentes.]

M1V (c.1A>G)	T338I (c.1013C>T)	R553X (c.1657C>T)	3272-26A>G (c.3140-26A>G)
CFTRdele2,3 (c.54-5940_273+10250del21kb)	S341P (c.1021T>C)	A559T (c.1675G>A)	L1065P (c.3194T>C)
Q39X (c.115C>T)	1154insTC (c.1022_1023insTC)	R560T (c.1679G>C)	R1066C (c.3196C>T)
E60X (c.178G>T)	R347H (c.1040G>A)	R560K (c.1679G>A)	R1066H (c.3197G>A)
P67L (c.200C>T)	R347P (c.1040G>C)	1811+1,6kbA>G (c.1679+1,6kbA>G)	L1077P (c.3230T>C)
R75X (c.223C>T)	R352Q (c.1055G>A)	1812-1G>A (c.1680-1G>A)	W1089X (c.3266G>A)
G85E (c.254G>A)	1213delT (c.1081delT)	E585X (c.1753G>T)	Y1092X(C>A) (c.3276C>A)
394delTT (c.262_263delTT)	1248+1G>A (c.1116+1G>A)	1898+1G>A (c.1766+1G>A)	Y1092X(C>G) (c.3276C>G)
405+1G>A (c.273+1G>A)	1259insA (c.1127_1128insA)	1898+3A>G (c.1766+3A>G)	M1101K (c.3302T>A)
406-1G>A (c.274-1G>A)	W401X (c.1202G>A)	2143delT (c.2012delT)	E1104X (c.3310G>T)
E92X (c.274G>T)	W401X (c.1203G>A)	2183AA >G (c.2051_2052delAAinsG)	R1158X (c.3472C>T)
E92K (c.274G>A)	1341+1G>A (c.1209+1G>A)	2184delA (c.2052delA)	R1162X (c.3484C>T)
Q98X (c.292C>T)	1461ins4 (c.1329_1330insAGAT)	2184insA (c.2052_2053insA)	3659delC (c.3528delC)
457TAT>G (c.325_327delTATinsG)	A455E (c.1364C>A)	R709X (c.2125C>T)	S1196X (c.3587C>G)
D110H (c.328G>C)	1525-1G>A (c.1393-1G>A)	K710X (c.2128A>T)	W1204X (c.3611G>A)
R117C (c.349C>T)	S466X (C>A) (c.1397C>A)	2307insA (c.2175_2176insA)	W1204X (c.3612G>A)
R117H (c.350G>A)	S466X (C>G) (c.1397C>G)	L732X (c.2195T>G)	3791delC (c.3659delC)
Y122X (c.366T>A)	L467P (c.1400T>C)	2347delG (c.2215delG)	3849+10kbC>T (c.3717+12191C>T)
574delA (c.442delA)	1548delG (c.1418delG) [†]	R764X (c.2290C>T)	G1244E (c.3731G>A)
621+1G>T (c.489+1G>T)	S489X (c.1466C>A)	2585delT (c.2453delT)	3876delA (c.3744delA)
663delT (c.531delT)	S492F (c.1475C>T)	E822X (c.2464G>T)	S1251N (c.3752G>A)
G178R (c.532G>A)	Q493X (c.1477C>T)	2622+1G>A (c.2490+1G>A)	3905insT (c.3773_3774insT)
711+1G>T (c.579+1G>T)	I507del (c.1519_1521delATC)	E831X (c.2491G>T)	W1282X (c.3846G>A)
711+3A>G (c.579+3A>G)	F508del (c.1521_1523delCTT)	W846X (c.2537G>A)	4005+1G>A (c.3873+1G>A)
711+5G>A (c.579+5G>A)	1677delTA (c.1545_1546delTA)	R851X (c.2551C>T)	4016insT (c.3884_3885insT)

712-1G>T (c.580-1G>T)	V520F (c.1558G>T)	2711delT (c.2583delT)	N1303K (c.3909C>G)
H199Y (c.595C>T)	Q525X (c.1573C>T) [†]	2789+5G>A (c.2657+5G>A)	Q1313X (c.3937C>T)
P205S (c.613C>T)	1717-8G>A (c.1585-8G>A)	Q890X (c.2668C>T)	4209TGTT>AA (c.4077_4080delTGTTinsAA)
L206W (c.617T>G)	1717-1G>A (c.1585-1G>A)	L927P (c.2780T>C)	CFTRdele22,23 (c.3964-78_4242+577del)
Q220X (c.658C>T)	G542X (c.1624G>T)	S945L (c.2834C>T)	4382delA (c.4251delA)
852del22 (c.720_741delAGGGAGAATGATGATGAAGTAC)	S549R (c.1645A>C)	3007delG (c.2875delG)	<i>PolyTG/PolyT</i>
1078delT (c.948delT)	S549N (c.1646G>A)	G970R (c.2908G>C)	<i>I506V (c.1516A>G)</i>
G330X (c.988G>T)	S549R (c.1647T>G)	3120G>A (c.2988G>A)	<i>I507V (c.1519A>G)</i>
R334W (c.1000C>T)	G551D (c.1652G>A)	3120+1G>A (c.2988+1G>A)	<i>F508C (c.1523T>G)</i>
I336K (c.1007T>A)	Q552X (c.1654C>T)	3121-1G>A (c.2989-1G>A)	

[†] Klassifisert i CFTR2-databasen¹² som en CF-fremkallende variant, mens Sosnay-publikasjonen¹³ klassifiserer varianten som ubestemt.

Databasereklassifikasjonen er nyere og gjenspeiler gjennomført funksjonell testing, som ikke var tilgjengelig på tidspunktet for Sosnay-publikasjonen.

Oppsummering og forklaring av Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

Analyseutforming

Alle proteinkodingsregioner i CFTR-genet, inkludert 10 nt flankerende intronsekvens, påvises for alle eksoner unntatt tre (ekson 7, 10 og 20). For ekson 7 og ekson 10 er kun 5 nt flankerende intronsekvens inkludert ved 5'-enden av eksonet for å unngå proksimale homopolymerisk indeler. For ekson 20, er 30 nt flankerende intronsekvens inkludert ved 5'-enden av eksonet for å kunne påvise mutasjonen 3272-26A>G. Analysen påviser også ~100 nt flankerende sekvens ved 5' og 3' UTR, 2 dype intronmutasjoner (1811+1,6kbA>G, 3489+10kbC>T), 2 store delesjoner (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23) og PolyTG/PolyT-regionen. Hele dekningen til analysen vises i de genomiske koordinatposisjonene som er oppgitt i **Tabell 3**.



MERK:

Det finnes begrensninger for påvisning av delesjoner ved spesifikke genomplasseringer i de sekvenserte regionene av denne analysen (se *Prosedyremessige begrensninger for Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay* på side 9).

Tabell 3 Genomisk koordinatdekning for Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

	hg19 Genomisk koordinatstart (kromosom 7)	hg19 Genomisk koordinatstopp (kromosom 7)	Lengde (basepar)
CFTR_Exon 1	117120041	117120211	171
CFTR_Exon 2	117144297	117144427	131
CFTR_Exon 3	117149078	117149206	129
CFTR_Exon 4	117170943	117171178	236
CFTR_Exon 5	117174320	117174429	110
CFTR_Exon 6	117175292	117175475	184
CFTR_Exon 7 [^]	117176597	117176737	141
CFTR_Exon 8	117180144	117180410	267

	hg19 Genomisk koordinatstart (kromosom 7)	hg19 Genomisk koordinatstopp (kromosom 7)	Lengde (basepar)
CFTR_Exon 9	117182060	117182172	113
CFTR_Exon 10 [^]	117188690	117188887	198
CFTR_Exon 11	117199508	117199719	212
CFTR_Exon 12	117227783	117227897	115
CFTR_Intron 12 [*]	117229516	117229526	11
CFTR_Exon 13	117230397	117230503	107
CFTR_Exon 14	117231978	117232721	744
CFTR_Exon 15	117234974	117235122	149
CFTR_Exon 16	117242870	117242927	58
CFTR_Exon 17	117243576	117243846	271
CFTR_Exon 18	117246718	117246817	100
CFTR_Exon 19	117250563	117250733	171
CFTR_Exon 20 [#]	117251605	117251872	268
CFTR_Exon 21	117254657	117254777	121
CFTR_Exon 22	117267566	117267834	269
CFTR_Intron 22 [*]	117280010	117280020	11
CFTR_Exon 23	117282482	117282657	176
CFTR_Exon 24	117292886	117292995	110
CFTR_Exon 25	117304732	117304924	193
CFTR_Exon 26	117305503	117305628	126
CFTR_Exon 27	117306952	117307262	311
Baser totalt			5203^{**}

[^] For ekson 7 og ekson 10 er kun 5 nt flankerende intronsekvens inkludert oppstrøms for eksonet for å unngå homopolymeriske strekninger i disse regionene. Når det gjelder ekson 10, er dette PolyT/Poly TG-regionen i intron 9. Denne regionen behandles spesielt og separat.

^{*} For de dype intronmutasjonene er også 5 nukleotider som flankerer SNV på begge sider, inkludert.

[#] For ekson 20 er 30 nt flankerende intronsekvens inkludert ved 5'-enden av eksonet for å kunne detektere mutasjonen 3272-26A>G.

^{**} Med de to store deleksjonene og PolyTG/PolyT-regionene er de totale posisjonene/regionene 5206.

Prosedyreprinsipper

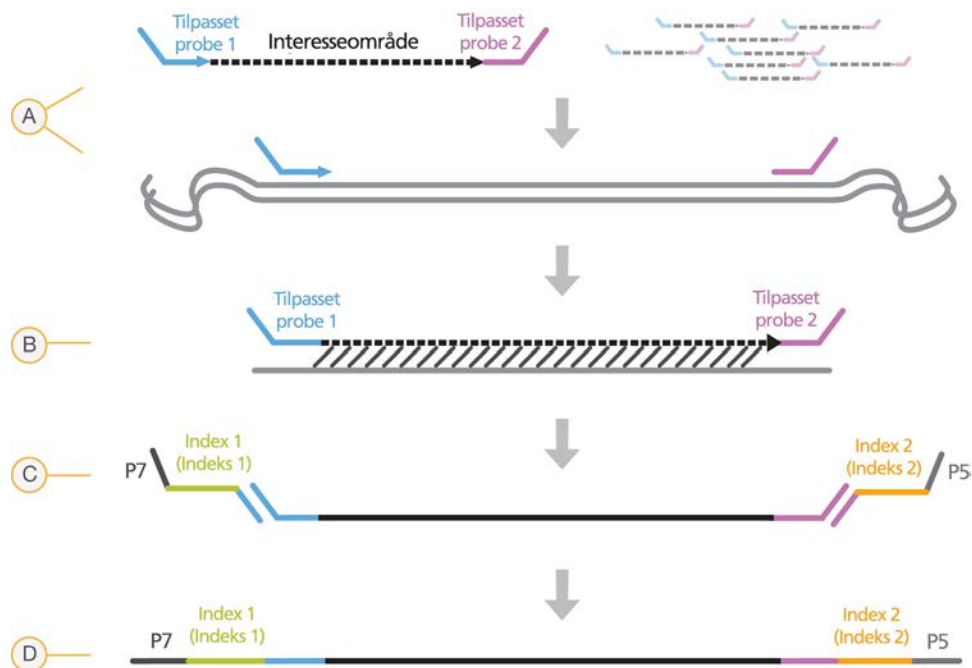
TruSight Cystic Fibrosis Library Prep er beregnet på manuell klargjøring av biblioteker som brukes til sekvensering av DNA fra prøver av perifert fullblod. Bibliotekklargjøring består av fire hovedtrinn: hybridisering, ekstensjonsligasjon, PCR-forsterkning og biblioteknormalisering.



MERK

Bibliotekklargjøringsprosedyrer for Cystic Fibrosis 139-Variant Assay og Clinical Sequencing Assay er identiske.

Bibliotekklargjøring



- A **Hybridisering** – Det første trinnet, hybridisering, hybridiserer en sammenslåing av oppstrøms- og nedstrømsoligonukleotider som er spesifikke for genet for cystisk fibrose for innmatning av genomisk DNA. På slutten av denne prosessen vil en tretrinns vaskeprosedyre med et filter som kan velge størrelse, fjerne ubundne oligonukleotider fra det genomiske DNA-et.
- B **Ekstensjonsligasjon** – Det andre trinnet, ekstensjonsligasjon, forbinder de hybridiserte oppstrøms- og nedstrømsoligonukleotidene. En DNA-polymerase strekker seg fra oppstrømsoligonukleotider gjennom målregionen, fulgt av ligasjon til 5'-enden på nedstrømsoligonukleotiden med en DNA-ligase. Resultatet er dannelse av produkter som inneholder de CF-spesifikke oligonukleotidene, flankert av sekvenser som kreves for forsterkning.
- C **PCR-forsterkning** – Det tredje trinnet, PCR-forsterkning, forsterker ekstensjonsligasjonsproduktene ved å bruke indeksadaptorene som legger til indekssekvenser for prøvemultipleksing, samt vanlige adaptorene som kreves for klyngegenerering på MiSeqDx. På slutten av denne prosessen vil en PCR-rengjøringsprosedyre rense PCR-produktene (kalt et bibliotek).
- D **Biblioteknormalisering** – Det siste trinnet, biblioteknormalisering, normaliserer kvantiteten i hvert bibliotek for å sørge for mer lik bibliotekrepresentasjon i det endelige sammenslåtte biblioteket. På slutten av denne prosessen lastes det sammenslåtte biblioteket på MiSeqDx for sekvensering ved hjelp av SBS-kjemi.

Sekvensering

SBS-kjemi bruker en reversibel terminator-metode for å påvise enkle nukleotidbaser idet de blir inkorporert i voksende DNA-strenger. Under hver sekvenseringssyklus tilsettes et enkelt fluorescensmerket deoksynukleotidtrifosfat (dNTP) i nukleinsyrekjeden. Nukleotidmerkingen fungerer som en terminator for polymerisering, slik at etter hver dNTP-inkorporering, blir det fluorescerende fargestoffet avbildet for å identifisere basen og deretter spaltet enzymatisk for å tillate inkorporering av neste nukleotid. Fordi alle de fire reversibel terminator-bundne dNTP-ene (A, G, T, C) finnes som enkle, separate molekyler, minimerer naturlig konkurranse integrasjonsavvik. Basebetegnelser dannes direkte fra signalintensitetsmålinger under hver sekvenseringssyklus. Resultatet er sekvensering base for base.

Dataanalyse

Det første trinnet i dataanalyse kalles primæranalyse. Denne prosessen utføres av programvare for sanntidsanalyse (RTA) og genererer basebetegnelser og kvalitetsscoreing. I neste trinn, kalt sekundæranalyse, blir basebetegnelsene som ble generert under primæranalyse, behandlet for å gi informasjon for hver prøve. Sekundæranalyse utføres av Local Run Manager Software og omfatter demultipleksing, FASTQ-filgenerering, innretting, variantbetegnelse og generering av VCF-filer som inneholder informasjon om varianter funnet ved spesifikke posisjoner i referansegenomet.

- ▶ **Demultipleksing** – Hvis kjøringen inneholder flere prøver og kjøringen har indeksavlesninger, er dette det første trinnet i sekundæranalyse. Demultipleksing skiller data fra sammenslåtte prøver basert på de unike sekvensindeksene som ble lagt til under PCR-forsterkningstrinnet.
- ▶ **FASTQ-filgenerering** – Etter demultipleksing genererer Local Run Manager intermediære filer i FASTQ-format, som er et tekstformat som brukes til å representere sekvenser. FASTQ-filer inneholder avlesningene for hver prøve og kvalitetsscorene, utenom avlesninger fra eventuelle klynger som ikke gikk gjennom filter.
- ▶ **Innretting** – Innretting sammenligner sekvenser mot referansen for å identifisere et forhold mellom sekvensene, og tilordner en score basert på likhetsregioner. Innrettede avlesninger skrives til filer i BAM-format. For Cystic Fibrosis 139-Variant Assay og Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay utfører en bundet Smith-Waterman-algoritme lokale sekvensinnrettinger for å bestemme lignende regioner mellom to sekvenser.
- ▶ **Variantbetegnelse** – Dette trinnet registrerer enkle nukleotidvarianter (SNV), insersjoner og delesjoner (indeler) og andre strukturvarianter i en standardisert tekstfil som heter TruSightCF139VariantAssay.txt for Cystic Fibrosis 139-Variant Assay eller TruSightCFClinicalSequencingAssay.txt for Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay.

Du finner mer informasjon om analysearbeidsprosessen i veiledningene for analyseprogramvaren som er installert på MiSeqDx. For *Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager CF 139-Variant 2.0 Analysis Module*, se (dokumentnr. 1000000100945). For *Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 Analysis Module*, se (dokumentnr. 1000000100946). For *Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager CF 139-Variant 2.0 Analysis Module*, se (dokumentnr. 200017946). For *Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 Analysis Module*, se (dokumentnr. 200017945).

Prosedyremessige begrensninger for Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

- ▶ Til *in vitro*-diagnostisk bruk.
- ▶ Resultatene som oppnås ved hjelp av Cystic Fibrosis 139-Variant Assay, skal brukes og tolkes i sammenheng med en full klinisk evaluering.
- ▶ Analysen er utformet for å identifisere et spesifikt delsett av kjente varianter i CFTR-genet, men inkluderer ikke alle identifiserte varianter i CFTR-genet. Helt spesifikt rapporterer analysen aminosyrenivåendringer hvis de er tilknyttet nukleotidendringene som er oppgitt i **Tabell 2**. Selv om andre nukleotidnivåendringer kan føre til de samme aminosyrenivåendringene, rapporteres de ikke av analysen. Derfor garanterer ikke manglende identifisering av en variant at andre CFTR-varianter ikke finnes i prøvene som analyseres.
- ▶ Varianter identifisert av denne analysen varierer i frekvens blant forskjellige populasjoner.
- ▶ Som ved alle hybridiseringsbaserte analyser kan underliggende polymorfismer eller varianter i oligonukleotidbindende regioner påvirke allelene som undersøkes, og derfor også betegnelsene som utføres.
- ▶ Analysen kan ikke bestemme om retningen til PolyTG/PolyT-varianten er i cis/trans i forhold til R117H-varianten. Når det gjelder pasienter med en R117H-variant, skal det utføres ytterligere testing for å bestemme om en PolyTG/PolyT-variant, som kan påvirke den kliniske fenotypen (f.eks., 12–13(TG) eller 5T), er i cis/trans-retning i forhold til R117H-varianten.
- ▶ PolyTG/PolyT er homopolymere regioner som er kjente for å være vanskelige å tolke med sekvensbaserte analyser på grunn av polymeraseglidning. En feilbetegnelsesfrekvens på 0,9 % (4/448) ble observert for PolyTG/PolyT-resultater som viste et ±1 TG-avvik ved sammenligning med toveis Sanger-sekvensering i **Tabell 16**.

Prosedyremessige begrensninger for Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

- ▶ Til *in vitro*-diagnostisk bruk.
- ▶ Resultatene som oppnås ved hjelp av Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay, skal brukes og tolkes i sammenheng med en full klinisk evaluering.
- ▶ Analysen sekvenserer følgende regioner i CFTR-genet:
 - ▶ Alle proteinkodingsregioner i CFTR-genet på tvers av 27 eksoner.
 - ▶ Mellom 5–10 baser flankerende intronsekvens.
 - ▶ 100 nukleotider av intronsekvens ved 5'- og 3'-utranslaterte regioner.
 - ▶ To dype intronmutasjoner (1811+1,6kbA>G, 3489+10kbC>T).
 - ▶ PolyTG/PolyT-sekvensen plassert i intron 9.
 - ▶ Totalt 5206 posisjoner/regioner av de mulige 188 702 baseparene i genet.
- ▶ Analysen er utformet for å sekvensere proteinkodingsregioner og intron/ekson-grenser for CFTR-genet, og omfatter ikke alle intronregioner og store delesjoner. Følgelig garanterer ikke et samlet villtyperesultat at andre mutasjoner/varianter av cystisk fibrose transmembran ledeevneregulator (CFTR) ikke finnes i prøvene som analyseres.
 - ▶ Analysen er utformet for å påvise to spesifikke store delesjoner: CFTRdele2,3 og CFTRdele22,23. Analysen kan ikke påvise eller rapportere om andre store delesjoner. Denne analysen er kun validert for insersjoner og delesjoner opptil og inkludert 3 bp i størrelse.
- ▶ Alle insersjoner/delesjoner blir venstreinnrettet i homopolymere regioner i motsetning til høyreinnrettet etter HGVS-nomenklatur. For eksempel identifiseres varianten c.313delA (med sekvenskontekst GAATC) som en G-ATC-delesjon, men delesjonen rapporteres i dbSNP som en GA-TC-delesjon. Et unntak fra dette er de 135 CF-variasjonene som er oppgitt i CFTR2 som sykdomsfremkallende (basert på variantdatabaseversjon 04/10/2012). Alle indeler i homopolymere regioner innenfor dette settet av variasjoner rapporteres å samsvare med forventet variantrapportering i henhold til CFTR2.¹³
- ▶ Analysen har en begrensning i påvisning av delesjoner på spesifikke genomplasseringer i de sekvenserte regionene. Genomiske koordinater som analysen ikke kan rapportere delesjoner for, er oppgitt i [Tabell 4](#). Analysen kan ikke påvise delesjoner som omfatter basen eller basene i begrensningskolonnen.

Tabell 4 Genomiske koordinater der delesjoner ikke kan påvises

CFTR-genregion	hg19 Genomiske koordinater (kromosom 7)
CFTR_Exon1	117120041; 117120211
CFTR_Exon3	117149091
CFTR_Exon4	117170953-117170954*; 117171082
CFTR_Exon5	117174362
CFTR_Exon6	117175417
CFTR_Exon7	117176621
CFTR_Exon8	117180176-117180177*
CFTR_Exon9	117182126
CFTR_Exon10	117188771
CFTR_Exon11	117199544-117199545*; 117199697
CFTR_Exon12	117227802
CFTR_Exon14	117232106-117232107*; 117232466-117232467*; 117232609
CFTR_Exon17	117243705; 117243843

CFTR-genregion	hg19 Genomiske koordinater (kromosom 7)
CFTR_Exon18	117246751
CFTR_Exon19	117250688
CFTR_Exon20	117251788
CFTR_Exon22	117267721
CFTR_Exon23	117282597
CFTR_Exon24	117292953
CFTR_Exon25	117304740-117304741*; 117304869
CFTR_Exon26	117305518
CFTR_Exon27	117307178

* Kun delesjoner som omfatter begge baser som er oppgitt her, kan ikke påvises. I for eksempel Exon8 kan kun delesjoner ≥ 2 bp som omfatter basene ved begge genomiske koordinater 117180176 og 117180177, ikke påvises. En enkelt basedelesjon ved 117180176 eller 117180177 kan påvises.

- ▶ Hvis den påvirkede koordinaten som er oppgitt i **Tabell 4**, er basen lengst mot venstre i en homopolymer region, kan ikke en delesjon i andre posisjoner i den homopolymere strekningen påvises, fordi den ikke kan skilles fra en delesjon ved den påvirkede koordinaten.
- ▶ Analysen kan ikke påvise totalt fem varianter som er oppgitt i ClinVar kliniske database (åpnet databaseversjonen desember 2014). Disse fem spesifikke variantene er inkludert i **Tabell 5**. Denne analysebegrensningen påvirker ingen varianter som er oppgitt i cystisk fibrose-databasen, CFTR2 (databaseversjon 04/10/2012). Ingen frekvensdata var tilgjengelige for noen av variantene.

Tabell 5 Kjente varianter som ikke påvises av Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

Variantnr.	ClinVar-ID	CFTR-genregion	Genom plassering (kromosom 7)	cDNA-navn (HGVS)	Proteinnavn (HGVS)	rs-ID
1	RCV000046424	CFTR_Exon3	117149091	c.168delA	p.Glu56Aspfs	rs397508269
2	RCV000046687	CFTR_Exon17	117243703-117243704*	c.2775_2776delTT	p.Leu926Alafs	rs397508433
3	RCV000046688	CFTR_Exon17	117243705	c.2777delT	p.Leu926Cysfs	rs397508434
4	RCV000046782	CFTR_Exon19	117250690*	c.3106delA	p.Thr1036Profs	rs397508497
5	RCV000046857	CFTR_Exon20	117251789*	c.3294delG	p.Trp1098Cysfs	rs397508534

* I disse tilfellene faller de påvirkede koordinatene innenfor en homopolymer region.

- ▶ Varianter identifisert av denne analysen varierer i frekvens blant forskjellige populasjoner. Det er ikke mulig å validere alle kombinasjoner av varianter som kan påvises i CFTR-genet med denne analysen. Det anbefales at nye og sjeldne varianter bekreftes av brukeren ved hjelp av en validert referansem metode.
- ▶ Som ved alle hybridiseringsbaserte analyser kan underliggende polymorfismer, mutasjoner, insersjoner eller delesjoner i oligonukleotidbindende regioner påvirke allelene som undersøkes, og derfor også betegnelsene som utføres.
- ▶ For komplekse varianter der en delesjon og insersjon skjer på samme sted, kan analysen rapportere det som to separate varianter i umiddelbar nærhet. Variantfasing evalueres ikke, og andre mulige løsninger for den påviste sekvensen må vurderes. Du finner et eksempel på en kompleks variant av en slik natur i **Tabell 6**.

Tabell 6 Kompleks variant, eksempel

Sekvenskontekst (referanse)	GAAGAAATT
Observerte sekvenser for variant	GAAT -- ATT
Forventet variant	Delesjon av GAA, insersjon av T (begge endringer på samme kromosom)
Variant(er) rapportert av analysen	SNP (G>T), delesjon av AA

- ▶ Hvis mer enn to varianter er identifisert for en prøve, anbefales det at brukeren verifiserer resultatet ved å gjenta prøven ved hjelp av MiSeqDx-instrumentet med et ferskt gDNA-ekstrakt for å utelukke krysskontaminasjon av prøven.

**MERK**

Haplotypefasing skal vurderes når det påvises to eller flere varianter. Denne analysen kan ikke bestemme om varianter er i cis/trans i forhold til andre varianter.

- ▶ Analysen kan ikke bestemme om retningen til PolyTG/PolyT-varianten er i cis/trans i forhold til andre varianter. Når det gjelder pasienter med en R117H-variant, skal det utføres ytterligere testing for å bestemme om en PolyTG/PolyT-variant, som kan påvirke den kliniske fenotypen (f.eks., 12-13(TG) eller 5T), er i cis/trans-retning. PolyTG/PolyT er homopolymere regioner som er kjente for å være vanskelige å sekvensere på grunn av polymeraseglidning.

Produktkomponenter

TruSight Cystic Fibrosis Kit består av følgende komponenter:

- ▶ TruSight Cystic Fibrosis Library Prep (katalognr. 20036925)

Reagenser som følger med

Reagenser for TruSight Cystic Fibrosis Library Prep leveres av Illumina. Settet kan konfigureres for 1–4 bruk med maksimalt 96 prøver per sett.

TruSight Cystic Fibrosis Library Prep, boks 1

Boks 1-reagenser leveres frosne og er stabile ved oppbevaring ved –25 °C til –15 °C. Reagensene er stabile i maksimalt 6 fryse/tine-sykluser frem til den angitte utløpsdatoen.

Tabell 7 Boks 1A preforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet	Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaring
Oligosammenslåing for cystisk fibrose	1 rør	600 µl	Bufret vandig løsning som inneholder oligonukleotider som er målrettet mot <i>CFTR</i> -genet.	–25 °C til –15 °C
Hybridiseringsbuffer	1 rør	4,32 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter og formamid.	–25 °C til –15 °C
Ekstensjonsligasjonsblanding	1 rør	4,8 ml	Bufret vandig løsning som inneholder proprietær blanding av DNA-polymeraser, DNA-ligase og dNTP-er.	–25 °C til –15 °C
Indeks 2-primere (A501–A508)	1 rør per primer	192 µl	PCR-primere med indekssekvenser og sekvenseringsadaptore.	–25 °C til –15 °C
Indeks 1-primere (A701–A712)	1 rør per primer	128 µl	PCR-primere med indekssekvenser og sekvenseringsadaptore.	–25 °C til –15 °C

Komponent	Kvantitet	Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaring
PCR-polymerase	1 rør	56 µl	Proprietær DNA-polymerase.	-25 °C til -15 °C
PCR-hovedblanding	1 rør	2,8 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter og dNTP-er.	-25 °C til -15 °C

Tabell 8 Boks 1B postforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet	Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaring
Biblioteknormaliseringsfortynner	1 rør	4,6 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter, 2-merkaptoetanol og formamid.	-25 °C til -15 °C
Bibliotekfortynningsbuffer	1 rør	4,5 ml	Bufret vandig løsning.	-25 °C til -15 °C
PhiX-internkontroll	1 rør	10 µl	Bufret vandig løsning som inneholder PhiX genomisk DNA.	-25 °C til -15 °C

TruSight Cystic Fibrosis Library Prep, boks 2

Boks 2-reagenser blir levert ved omgivelsestemperatur og er stabile når de oppbevares ved 15 °C til 30 °C inntil den angitte utløpsdatoen.

Tabell 9 Boks 2 preforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet	Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaring
Filterplate	4 plater	I/A	Mikrotiterplate av polypropylen med en modifisert polyetersulfonmembran.	15 °C til 30 °C

Tabell 10 Boks 2 postforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet	Fyllingsvolum (ml)	Aktive ingredienser	Oppbevaring
Elueringsbuffer	1 rør	4,8	Bufret vandig løsning	15 °C til 30 °C
Biblioteklagringsbuffer	1 rør	3,5	Bufret vandig løsning	15 °C til 30 °C

TruSight Cystic Fibrosis Library Prep, boks 3

Boks 3-reagenser blir levert nedkjølte og er stabile når de oppbevares ved 2 °C til 8 °C inntil den angitte utløpsdatoen.

Tabell 11 Boks 3A preforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet	Fyllingsvolum (ml)	Aktive ingredienser	Oppbevaring
Stringent vaskebuffer	1 flaske	24	Bufret vandig løsning som inneholder salter, 2-merkaptoetanol og formamid.	2 °C til 8 °C
Universalvaskebuffer	1 rør	4,8	Bufret vandig løsning som inneholder salter.	2 °C til 8 °C

Tabell 12 Boks 3B postforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet	Fyllingsvolum (ml)	Aktive ingredienser	Oppbevaring
PCR-rengjøringskuler	1 rør	5	Bufret vandig løsning som inneholder fast fase-paramagnetiske kuler og polyetylenglykol.	2 °C til 8 °C
Vaskeløsning for biblioteknormalisering	2 rør	4,8	Bufret vandig løsning som inneholder salter, 2-merkaptoetanol og formamid.	2 °C til 8 °C
Bibliotekskuler	1 rør	1,2	Bufret vandig løsning som inneholder fast fase-paramagnetiske kuler.	2 °C til 8 °C

Reagenser som er påkrevd, men som ikke følger med

Preforsterkningsreagenser

- ▶ 10 N NaOH (klargjort fra tabletter, eller bruk en standardoppløsning)
- ▶ TE-buffer
- ▶ RNase/DNase-fritt vann

Postforsterkningsreagenser

- ▶ 10 N NaOH (klargjort fra tabletter, eller bruk en standardoppløsning)
- ▶ Etanol (EtOH), alkoholinhold 200, for molekylær biologi
- ▶ TE-buffer
- ▶ RNase/DNase-fritt vann

MiSeqDx-reagenser

- ▶ MiSeqDx Reagent Kit v3 (katalognr. 20012552 eller 20037124, avhengig av region) eller MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (katalognr. 20063860)
- ▶ 5 % natriumhypokloritt
- ▶ Tween 20
- ▶ Vann av laboratorie kvalitet

Oppbevaring og håndtering

- 1 Romtemperatur defineres som 15 °C til 30 °C.
- 2 Hybridiseringsbuffer-, stringent vaskebuffer- og biblioteknormaliseringsfortynnerreagenser kan danne synlig bunnfall eller krystaller. Før de brukes, skal de roteres kraftig og deretter kontrolleres visuelt for å påse at det ikke er bunnfall til stede.
- 3 Følg denne beste praksisen når du håndterer PCR-rengjøringskuler og bibliotekskuler:
 - ▶ Kulene skal aldri fryses.
 - ▶ La kulene nå romtemperatur.
 - ▶ Umiddelbart før bruk skal kulene roteres til de er godt suspendert og fargen er homogen.
 - ▶ Bland prøven grundig etter at kulene er tilsatt, ved å pipettere opp og ned 10 ganger. En ryster kan brukes til grundig blanding av prøver.
 - ▶ Inkuber kule/prøve-blanding ved romtemperatur i hele den angitte tiden.

- ▶ Følg instruksjonene når du bruker magnetstativet. Vent til oppløsningen er klar før du aspirerer. La platen ligge på magnetstativet mens supernatanten aspireres langsomt, og vær nøye med ikke å bevege de atskilte kulene.
- 4 Ikke frys bibliotekkulene, og ikke bland dem med biblioteknormaliseringsfortynnerreagenset hvis de ikke skal brukes umiddelbart.

Utstyr og materiell

Utstyr og materialer som følger med, selges separat

- ▶ MiSeqDx-instrument, katalognr. DX-410-1001
- ▶ TruSeq Index Plate Fixture Kit, katalognr. FC-130-1005
- ▶ TruSeq Index Plate Fixture & Collar Kit, katalognr. FC-130-1007
- ▶ Utskiftingshetter for indeksadapter, katalognr. DX-502-1003
- ▶ MiSeq-rør, katalognr. MS-102-9999

Nødvendig utstyr og materiell som ikke følger med

Utstyr og materiell til preforsterkning

- ▶ **Varmeblokk** – Det kreves én varmeblokk for en 96-brønners plate. Varmeblokker med oppvarmede lokk er akseptable å bruke. Bruk av termosyklere eller varmeblokker med aktiv avkjøling (f.eks. Peltier, termoelektrisk avkjølt) anbefales ikke for hybridiseringstrinnet. Det passive nedkjølingstrinnet er kritisk for riktig hybridisering. Varmeblokken skal oppfylle følgende ytelsesspesifikasjoner:
 - ▶ Temperaturområde: Omgivelse +5 °C til 99 °C
 - ▶ Temperaturregulering: ± 0,1 °C ved 37 °C, ± 0,4 °C ved 60 °C
- ▶ **Prøveinkubator** – Én inkubator (hybridiseringsovn) er påkrevd. Inkubatoren må oppfylle følgende ytelsesspesifikasjoner:
 - ▶ Temperaturområde: 10 °C til 100 °C
 - ▶ Temperaturregulering: ± 0,2 °C
- ▶ **Bordsentrifuge** – Det kreves en temperaturstyrt bordsentrifuge som er i stand til å opprettholde 20 °C. En separat sentrifuge er påkrevd i postforsterkningsområdet. Alle platesentrifuger som har plass til en 96-brønners plate med filterenhet og oppnår de nødvendige hastighetene for protokollen (280 til 2400 × g), er akseptable.
- ▶ **Presisjonsdråpetellere** – Ett sett med presisjonsdråpetellere er påkrevd. Et separat sett er påkrevd i postforsterkningsområdet. Bruk av presisjonsdråpetellere er påkrevd for å sørge for nøyaktig reagens- og prøvetilførsel. Dråpetellere med enkel kanal eller flere kanaler kan brukes hvis de blir kalibrert regelmessig og er nøyaktige innen 5 % av oppgitt volum.
- ▶ **Forbruksmateriell** – Følgende forbruksmateriell kreves:
 - ▶ 96-brønners PCR-plater med kant, 0,2 ml, polypropylen eller tilsvarende
 - ▶ 96-brønners oppbevaringsplater, 0,8 ml (MIDI-plater)
 - ▶ Oppløsningsbeholder, PVC, DNase, RNase-fri (kar)
 - ▶ Klebende aluminiumsfolieforsegling
 - ▶ Aktuell PCR-plateforsegling
 - ▶ Aerosolresistente dråpetellerspisser
 - ▶ Kjegleformede rør, 15 ml

Utstyr og materiell til postforsterkning

- ▶ **Termosyklere** – Én termosyklere er påkrevd. Termosykleren skal ha et oppvarmet lokk og oppfylle følgende ytelsesspesifikasjoner:
 - ▶ Temperaturkontrollområde: 4 °C til 99 °C

- ▶ Kontrollnøyaktighet: $\pm 0,25$ °C fra 35 °C til 99 °C
- ▶ **Mikroplateryster** – Én mikroplateryster er påkrevd i bibliotekets postforsterkningsområde. Platerysteren skal oppfylle følgende ytelsesspesifikasjoner:
 - ▶ Maks. blandehastighet: 3000 o/min
 - ▶ Blandehastighetsområde: 200 til 3000 o/min
- ▶ **Bordsentrifuge** – Det kreves én bordsentrifuge som er i stand til å opprettholde 20 °C. En separat sentrifuge er påkrevd i preforsterkningsområdet. Alle platesentrifuger som oppnår de nødvendige hastighetene for protokollen (280 til 2400 x g) er akseptable.
- ▶ **Varmeblokk** – Det kreves én varmeblokk for rør. Varmeblokken skal oppfylle følgende ytelsesspesifikasjoner:
 - ▶ Temperaturområde: Omgivelse +5 °C til 99 °C
 - ▶ Temperaturregulering: $\pm 0,1$ °C ved 37 °C, $\pm 0,4$ °C ved 60 °C
- ▶ **Magnetstativ** – Det kreves ett magnetstativ for en 96-brønners plate. Bedre ytelse oppnås når magnetene er på siden av stativet og ikke på bunnen.
- ▶ **Presisjonsdråpetellere** – Ett sett med presisjonsdråpetellere er påkrevd. Et separat sett er påkrevd i preforsterkningsområdet. Bruk av presisjonsdråpetellere er påkrevd for å sikre nøyaktig reagens- og prøvetilførsel. Dråpetellere med enkel kanal eller flere kanaler kan brukes hvis de blir kalibrert regelmessig og er nøyaktige innen 5 % av oppgitt volum.
- ▶ **Bordsentrifuge** – Det kreves en temperaturstyrt sentrifuge som er i stand til å opprettholde 20 °C og har plass til mikrosentrifugerør. Alle sentrifuger som oppnår de nødvendige hastighetene for protokollen (280 til 1000 x g), er akseptable.
- ▶ **Forbruksmateriell** – Følgende forbruksmateriell kreves:
 - ▶ 96-brønners PCR-plater med kant, 0,2 ml, polypropylen eller tilsvarende
 - ▶ 96-brønners oppbevaringsplater, 0,8 ml (MIDI-plater)

**MERK**

Sørg for at 96-brønners platen er kompatibel med magnetstativet.

- ▶ Kjegleformede rør, 15 ml og 50 ml
- ▶ Mikrosentrifugerør (skrukork anbefales)
- ▶ Åtterørs PCR-strimler
- ▶ Oppløsningsbeholdere, PVC, DNase, RNase-frie (kar)
- ▶ Klebende aluminiumsfolieforseglinger
- ▶ Klebende platefarseglinger til engangsbruk
- ▶ Aerosolresistente dråpetellerspisser

Prøvetaking, transport og oppbevaring

**MERK**

Håndter alle prøver som om de er potensielt smittefarlige stoffer.

- ▶ Fullblodsprøver tatt i K₂EDTA-rør kan brukes.
- ▶ Fullblodsprøver kan oppbevares i maks. 7 dager ved romtemperatur, opptil 30 dager ved 2 °C til 8 °C eller opptil 30 dager hvis de er frosset ved -25 °C til -15 °C.
- ▶ Fullblod skal transporteres i maks. 7 dager i romtemperatur, 30 dager ved 2 °C til 8 °C eller 30 dager hvis de er frosset ved -25 °C til -15 °C. Transport av fullblod skal overholde statlige og lokale bestemmelser for transport av etiologiske agenser.
- ▶ Det ble ikke observert påvirkning på analysens ytelse da genomisk DNA ble utsatt for opptil 6 fryse-/tinesykluser.

- ▶ Det ble ikke observert påvirkning på analysens ytelse med fullblodsprøver med forhøyet bilirubin, kolesterol, triglyserid, EDTA eller hemoglobin til stede.

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.



ADVARSEL

Dette reagenssettet inneholder potensielt farlige kjemikalier. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk verneutstyr, inkludert vernebriller, hansker og laboratoriefrakk som er egnet ved risiko for eksponering. Brukte reagenser skal behandles som kjemisk avfall og kastes i samsvar med gjeldende regionale, nasjonale og lokale lover og forskrifter. Du finner mer informasjon knyttet til helse, miljø og sikkerhet i sikkerhetsdatabladet på support.illumina.com/sds.html. (Du finner mer informasjon under *Reagenser som følger med på side 11.*)

- ▶ Noen komponenter i denne analysen inneholder 2-merkaptoetanol, et reduksjonsmiddel. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk i et godt ventilert område, og kast tomme beholdere og ubrukt innhold i samsvar med gjeldende lokale bestemmelser. Du finner mer informasjon knyttet til helse, miljø og sikkerhet i sikkerhetsdatabladet på support.illumina.com/sds.html. (Du finner mer informasjon under *Reagenser som følger med på side 11.*)
- ▶ Noen komponenter i denne analysen inneholder formamid, et alifatisk amid som kan skade forplantningsevnen. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk verneutstyr, inkludert vernebriller, hansker og laboratoriefrakk. Håndter brukte reagenser som kjemisk avfall, og kast dem i samsvar med gjeldende lokale bestemmelser. Du finner mer informasjon knyttet til helse, miljø og sikkerhet i sikkerhetsdatabladet på support.illumina.com/sds.html. (Du finner mer informasjon under *Reagenser som følger med på side 11.*)
- ▶ Alvorlige uønskede hendelser knyttet til dette produktet skal umiddelbart rapporteres til Illumina og ansvarlige myndigheter i medlemslandet der brukeren og/eller pasienten befinner seg.
- ▶ Håndter alle prøver som om de er potensielt smittefarlige stoffer.
- ▶ Hvis du unnlater å følge prosedyrene som beskrevet, kan det resultere i feil resultater eller betydelig reduksjon i prøve kvaliteten.
- ▶ Bruk rutinemessige forholdsregler for laboratoriet. Ikke pipetter med munnen. Ikke spis, drikk eller røyk i utpekte arbeidsområder. Bruk engangshansker og laboratoriefrakker når du håndterer prøver og analysereagenser. Vask hendene grundig etter å ha håndtert prøvene og analysereagensene.
- ▶ Ikke bruk noen analysekomponenter etter utløpsdatoen som er angitt på etiketten på analysekartongen. Ikke bytt om analysekomponenter fra ulike analysepartier. Analysepartier kan identifiseres på etiketten på analysekartongen.
- ▶ For å hindre nedbrytning av prøver eller reagens må du kontrollere at all natriumhypoklorittdamp er fullstendig oppløst før protokollen startes.
- ▶ 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.
- ▶ Endringer i de leverte reagensenes fysiske utseende kan indikere nedbrytning av materialene. Hvis det forekommer endringer i det fysiske utseendet (for eksempel åpenbare endringer i reagensfarge eller uklarhet sammen med mikrobiell kontaminasjon), skal ikke reagensene brukes.

- ▶ For å hindre kontaminasjon må du fysisk skille preforsterknings- og postforsterkningsområdene og sørge for at preforsterknings- og postforsterkningsområdene har sitt eget utstyr (som dråpetellere, dråpetellerspisser, roterer og sentrifuge).
- ▶ Unngå krysskontaminasjon. Bruk nye dråpetellerspisser mellom prøvene og mellom dispensering av reagenser. Bland prøver med en dråpeteller, og sentrifuger platen når dette angis. Ikke roter platene. Bruk av aerosolresistente spisser reduserer risikoen for carryover av amplicon og krysskontaminasjon fra prøve til prøve.
- ▶ Indeks-prøvesammenkobling må være i samsvar med prøveinformasjon som er angitt for MiSeqDx-kjøringen. Misforhold mellom prøveinformasjon og plateoppsettet vil føre til tap av positiv prøveidentifikasjon og uriktig resultatrapportering.
- ▶ Klargjør alltid ny 80 % etanol for vasketrinnene. Etanol kan absorbere vann fra luften, noe som påvirker resultatene.
- ▶ Følg de angitte tørketidene etter magnetstativtrinnet for å sikre at etanol fordamper fullstendig. Rester av etanol kan påvirke ytelsen til påfølgende reaksjoner.
- ▶ Oppbevar analysekomponentene ved angitt temperatur i utpekte preforsterknings- og postforsterkningsområder.
- ▶ Gjentatte fryse/tine-sykluser (opptil 6) av boks 1-komponentene ødelegger ikke analysens integritet.
- ▶ Ikke bland oligosammenslåing for cystisk fibrose og hybridiseringsbuffer ved oppbevaring. Når de kombineres, blir oligosammenslåing for cystisk fibrose ustabil, selv ved oppbevaring i frosset tilstand.
- ▶ Bruk av termosyklere med aktiv avkjøling (f.eks. Peltier, termoelektrisk avkjølt) anbefales ikke for hybridiseringstrinnet. Det passive nedkjølingstrinnet er kritisk for riktig hybridisering.
- ▶ Tilsett alltid PCR-polymerase til PCR-hovedblandingen umiddelbart før bruk. Kombinert hovedblanding må aldri oppbevares.
- ▶ Under biblioteknormaliseringstrinnet er det ekstremt viktig å resuspendere bibliotekulepelletten fullstendig. Dette er avgjørende for å oppnå konsekvent klyngetetthet på MiSeqDx-instrumentets strømningscelle.
- ▶ Følg de oppgitte inkubasjonstidene i biblioteknormaliseringstrinnet. Feil inkubasjon kan påvirke bibliotekrepresentasjonen og klyngetettheten.
- ▶ På grunn av antall plateoverføringer og derved mulighet for kontaminasjon, skal du være ekstremt forsiktig for å sikre at brønninnholdet forblir fullt ut i brønnen. Innholdet skal ikke sprute.
- ▶ Anbefalingen for DNA-innmatingen på 250 ng gir rom for DNA-kvantitetsvariasjon. Analyseytelse drives av dette innmatingsnivået.
- ▶ Prøvevarianter med en Ingen betegnelse-angivelse på testrapporten indikerer at dataene for denne variantposisjonen ikke nådde definerte sekvenseringsterskler. Ikke rapporter varianter med en Ingen betegnelse-angivelse med mindre gjentatt testing gir verdier som når definerte terskler og ikke lenger er angitt som Ingen betegnelse.

Akronymer

Tabell 13 Akronymer for TruSight Cystic Fibrosis Library Prep

Akronym	Definisjon
AMP	AMplification Plate (Forsterkningsplate)
CLP	CLean-up Plate (Rengjøringsplate)
DAL	Diluted Amplicon Library (Fortynnet ampliconbibliotek)
FPU	Filter Plate Unit (Filterplateenhet)
HYB	HYBridization Plate (Hybridiseringsplate)

Akronym	Definisjon
LNP	Library Normalization Plate (Biblioteknormaliseringsplate)
NTC	No Template Control (Ingen malkontroll)
PAL	Pooled Amplicon Library (Sammenslått ampliconbibliotek)
SGP	StoraGe Plate (Oppbevaringsplate)

Tilleggsressurser

På støttesidene for TruSight Cystic Fibrosis på Illuminas nettsted finner du programvare, opplæringsressurser, informasjon om produktkompatibilitet og dokumentasjonen som følger. Sjekk alltid støttesider for de nyeste versjonene.

Ressurs	Beskrivelse
<i>Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager CF 139-Variant 2.0 Analysis Module (dokumentnr. 1000000100945)</i>	Gir instruksjoner om å konfigurere kjøringsparametere for sekvensering og analyse for CF 139-Variant 2.0 Analysis Module.
<i>Arbeidsflytveiledning for Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 Analysis Module (dokumentnr. 1000000100946)</i>	Gir instruksjoner om å konfigurere kjøringsparametere for sekvensering og analyse for CF Clinical Seq 2.0 Analysis Module.
<i>Arbeidsflytveiledning for Local Run Manager CF 139-Variant 2.0 Micro Analysis Module (dokumentnr. 200017946)</i>	Gir instruksjoner om å konfigurere kjøringsparametere for sekvensering og analyse for CF 139-Variant 2.0 Micro Analysis Module.
<i>Arbeidsflytveiledning for Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 Micro Analysis Module (dokumentnr. 200017945)</i>	Gir instruksjoner om å konfigurere kjøringsparametere for sekvensering og analyse for CF Clinical Seq 2.0 Micro Analysis Module.
<i>Referanseveiledning for Local Run Manager Software for MiSeqDx (dokumentnr. 1000000011880)</i>	Gir instruksjoner om å opprette en kjøring, overvåke status, analysere sekvenseringsdata og vise resultater på MiSeqDx-instrumentet.
<i>Referanseveiledning for MiSeqDx-instrumentet for MOS v2 (dokumentnr. 1000000021961)</i>	Gir instruksjoner om å konfigurere og sekvensere kjøring, inkludert vedlikeholdsprosedyrer for MiSeqDx-instrumentet.

Prosedyremessige merknader

- ▶ Illumina krever at én positiv kontroll-DNA-prøve og en negativ kontroll (NTC eller kontroll uten mal) er inkludert for hver kjøring, som defineres som et sett med prøver som behandles parallelt. Den positive kontroll-DNA-prøven skal være en godt karakterisert prøve med én eller flere kjente CFTR-varianter. Illumina anbefaler å bruke en villtypekontroll. Villtypekontrollen skal kjøres som en prøve og skal ikke erstatte den positive eller negative kontrollen.
- ▶ Oppbevar analysekomponentene ved angitt temperatur i utpekte preforsterknings- og postforsterkningsområder.
- ▶ Gjentatte fryse/tine-sykluser (opptil 6) av boks 1-komponentene ødelegger ikke analysens integritet.

Prøveklargjøring

Før du starter Cystic Fibrosis 139-Variant Assay eller Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay, ekstraherer og kvantifiserer du DNA-et fra fullblod.

- ▶ Hvilken som helst validert DNA-ekstraksjonsmetode kan brukes.
- ▶ Kvantifiser DNA-et ved hjelp av et spektrofotometer. Sørg for at A260/A280 for DNA-prøven er > 1,5. Normaliser DNA-prøven til 50 ng/µl. Hver prøve krever 5 µl genomisk DNA (totalt 250 ng).

Prøvegjenløp

For Cystic Fibrosis 139-Variant Assay og Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay kan prøvekapasiteten være 24–96 prøver med MiSeqDx Reagent Kit v3 og 24–36 prøver for MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro.

Indekseringsprimerne som brukes under PCR-forsterkningen må være valgt på grunnlag av ønsket endelig prøvegjenløp for å sikre at hvert bibliotek bruker en unik indekskombinasjon.



MERK

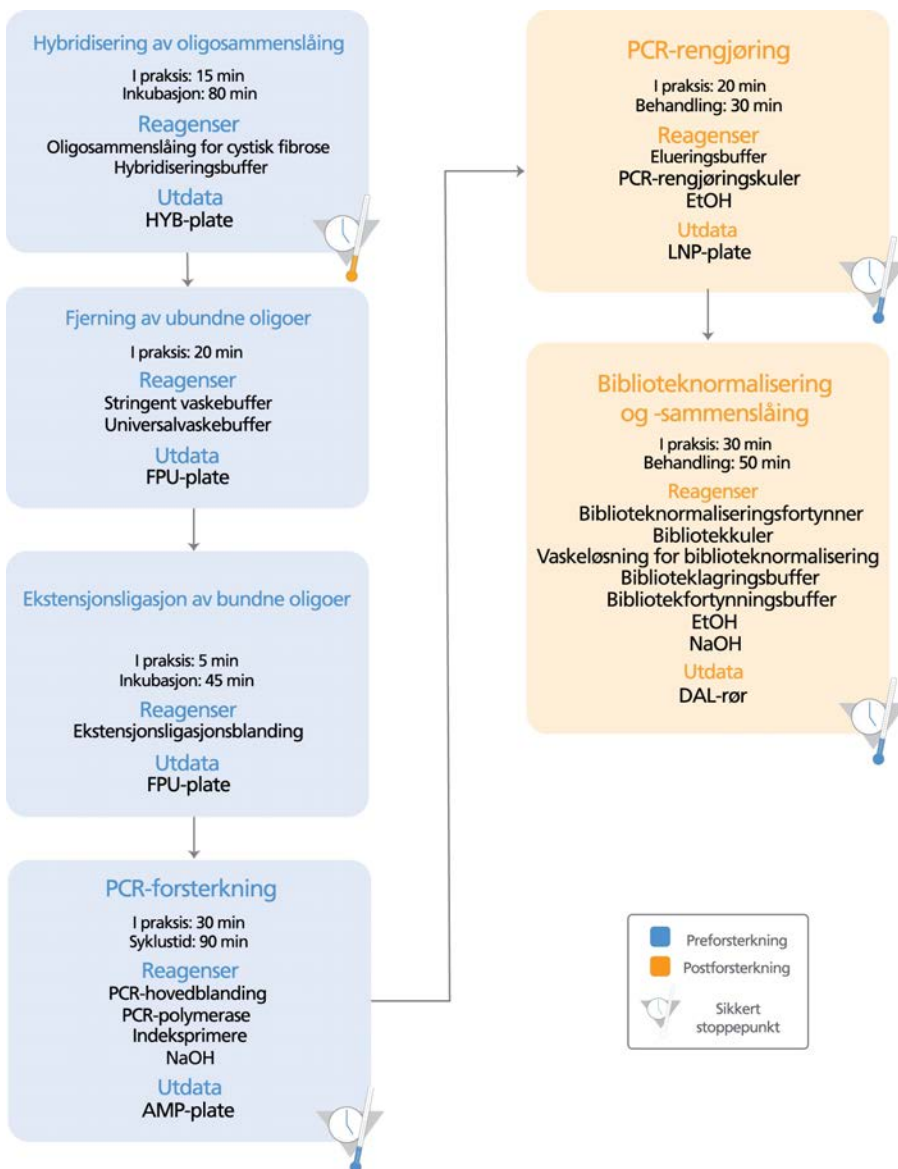
Illumina godkjenner ikke bruk med færre enn 24 prøver.

Arbeidsprosess for bibliotekklargjøring

Diagrammet som følger illustrerer arbeidsprosessen for bibliotekklargjøring for Cystic Fibrosis 139-Variant Assay og Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay. Preforsterkningstrinn omfatter: hybridisering av oligosammenslåing, fjerning av ubundne oligoer og ekstensjonsligasjon av bundne oligoer. I forbindelse med PCR-forsterkningstrinnet utføres PCR-plateoppsettet i preforsterkningsområdet, mens PCR på termosyklere skjer i postforsterkningsområdet. Postforsterkningstrinn omfatter: PCR-rengjøring og biblioteknormalisering og -sammenslåing.

Sikre stoppunkter er merket mellom trinn.

Figur 1 Arbeidsprosess for bibliotekklargjøring for Cystic Fibrosis 139-Variant Assay og Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay



Bruksanvisning

TruSight Cystic Fibrosis Library Prep støtter to analyser: Cystic Fibrosis 139-Variant Assay og Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay. TruSight Cystic Fibrosis-arbeidsprosessen omfatter analysevalg, bibliotekklargjøring, sekvensering og etter kjøring-vask. Med unntak av analysevalg er alle prosedyretrinn identiske for begge analyser.

Analysevalg og kjøringssoppsett

- ▶ Hvis du skal bruke Cystic Fibrosis 139-Variant Assay, se *Bruke Local Run Manager CF 139-Variant 2.0 Analysis Module* på side 21.

- ▶ Du kan også se i denne delen for å få instruksjoner om bruk av Local Run Manager CF-139 Variant 2.0 Micro Analysis Module. I så fall må du velge **CF 139-Variant 2.0 Micro** når du oppretter kjøringen, i stedet for CF 139-Variant 2.0.
- ▶ Hvis du skal bruke Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay, se *Bruke Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 Analysis Module* på side 22.
 - ▶ Du kan også se i denne delen for å få instruksjoner om bruk av Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 Micro Analysis Module. I så fall må du velge **CF Clinical Seq 2.0 Micro** når du oppretter kjøringen, i stedet for CF Clinical Seq 2.0.

Bruke Local Run Manager CF 139-Variant 2.0 Analysis Module

Angi parametere

- 1 Logg på Local Run Manager.
- 2 Velg **Create Run** (Opprett kjøring), og velg deretter **CF 139-Variant 2.0**.
- 3 Skriv inn et kjørningsnavn som identifiserer kjøringen fra sekvensering til analyse.
Bruk alfanumeriske tegn, mellomrom, understrekingstegn eller bindestreker (maksimalt 40 tegn).
- 4 **[Valgfritt]** Legg inn en beskrivelse av kjøringen.
Bruk alfanumeriske tegn, mellomrom, understrekingstegn eller bindestreker (maksimalt 150 tegn).
- 5 Skriv lotnummeret og utløpsdatoen for bibliotekklargjøringssettet.

Spesifisere prøvene for kjøringen

Spesifiser prøvene for kjøringen ved å velge ett av følgende alternativer.

- ▶ **Enter samples manually** (Angi prøver manuelt) – Bruk den tomme tabellen på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring). Foreslåtte prøvebrønner utheves.
- ▶ **Import samples** (Importer prøver) – Naviger til en ekstem fil i kommadelt CSV-format. En mal kan lastes ned på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring).

Legge inn prøver manuelt

- 1 Angi et unikt prøvenavn i feltet Sample Name (Prøvenavn).
Bruk alfanumeriske tegn, bindestreker eller understrekingstegn (maksimalt 40 tegn).
- 2 Høyreklikk, og velg positive eller negative kontrollprøver.
For å lagre en kjøring må den ha minst én positiv og én negativ kontroll.
- 3 **[Valgfritt]** Angi en prøvebeskrivelse i fanen Sample Description (Prøvebeskrivelse).
Bruk alfanumeriske tegn, bindestreker eller understrekingstegn (maksimalt 50 tegn).
- 4 **[Valgfritt]** Velg en Indeks 1-adapter fra rullegardinlisten Index 1 (Indeks 1) (i7).
Dette trinnet er valgfritt fordi indekskombinasjonene i7 og i5 fylles ut automatisk med en standard layout.
- 5 **[Valgfritt]** Velg en Indeks 2-adapter fra rullegardinlisten Index 2 (Indeks 2) (i5).
Dette trinnet er valgfritt fordi indekskombinasjonene i7 og i5 fylles ut automatisk med en standard layout.
- 6 Velg ikonet **Print** (Skriv ut) for å vise plateoppsettet.
- 7 Velg **Print** (Skriv ut) for å skrive ut plateoppsettet som en referanse for klargjøring av biblioteker.
- 8 **[Valgfritt]** Velg **Export** (Eksporter) for å eksportere prøveinformasjonsfilen.
- 9 Velg **Save Run** (Lagre kjøring).
Hvis du har lagt inn færre enn 24 prøver, vises vinduet Insufficient Sample (Utilstrekkelig prøve). Velg **Proceed** (Fortsett) for å fortsette, eller velg **Cancel** (Avbryt) for å redigere prøvene.



FORSIKTIG

Sekvensering med sammenslåtte biblioteker som inneholder færre enn 24 prøver, er ikke validert av Illumina.

Importere prøver

Prøveinformasjon kan importeres fra to filtyper:

- ▶ En fil med prøveinformasjon som ble eksportert tidligere fra CF 139-Variant 2.0-modulen med funksjonen Export (Eksporter).
- ▶ En malfil, som kan genereres ved å velge **Template** (Mal) i skjembildet Create Run (Opprett kjøring). Malfilen inneholder korrekte kolonneoverskrifter for import med plassholder-informasjon i hver kolonne. Bruk et eksternt redigeringsprogram for å tilpasse malfilen:
 - 1 Legg til prøveinformasjon for hver prøve i kjøringen.
 - 2 Når all prøveinformasjon er lagt til, sletter du plassholder-informasjonen som står igjen i de ubrukte cellene.
 - 3 Lagre malfilen.

Slik importerer du prøveinformasjon:

- 1 Velg **Import Samples** (Importer prøver), bla deg frem til filen og velg den.
- 2 Velg 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).
Hvis du har lagt inn færre enn 24 prøver, vises vinduet Insufficient Sample (Utilstrekkelig prøve). Velg **Proceed** (Fortsett) for å fortsette, eller velg **Cancel** (Avbryt) for å redigere prøvene.

**FORSIKTIG**

Sekvensering med sammenslåtte biblioteker som inneholder færre enn 24 prøver, er ikke validert av Illumina.

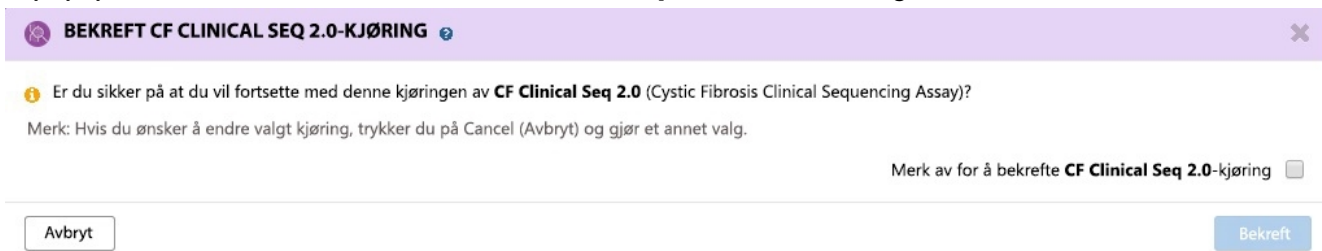
Redigere en kjøring

Instruksjoner om hvordan du redigerer informasjonen i kjøringen før sekvensering, finnes i *Referanseveiledning for Local Run Manager Software for MiSeqDx (dokumentnr. 1000000011880)*.

Bruke Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 Analysis Module

Angi parametere

- 1 Logg på Local Run Manager.
- 2 Velg **Create Run** (Opprett kjøring), og velg **CF Clinical Seq 2.0**.
Et popup-vindu vises for å bekrefte at **CF Clinical Seq 2.0** er det rette valget.



- 3 Velg avmerkingsboksen og velg **Confirm** (Bekreft) for å fortsette (eller velg **Cancel** (Avbryt) for å gå tilbake til hovedskjembildet).
- 4 Skriv inn et kjørningsnavn som identifiserer kjøringen fra sekvensering til analyse.
Bruk alfanumeriske tegn, mellomrom, understrekingstegn eller bindestreker (maksimalt 40 tegn).
- 5 **[Valgfritt]** Legg inn en beskrivelse av kjøringen.
Bruk alfanumeriske tegn, mellomrom, understrekingstegn eller bindestreker (maksimalt 150 tegn).
- 6 Skriv lotnummeret og utløpsdatoen for bibliotekklargjøringssettet.

Spesifisere prøvene for kjøringen

Spesifiser prøvene for kjøringen ved å velge ett av følgende alternativer.

- ▶ **Enter samples manually** (Angi prøver manuelt) – Bruk den tomme tabellen på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring). Foreslåtte prøvebrønner utheves.
- ▶ **Import samples** (Importer prøver) – Naviger til en ekstem fil i kommadelt CSV-format. En mal kan lastes ned på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring).

Legge inn prøver manuelt

- 1 Angi et unikt prøvenavn i feltet Sample Name (Prøvenavn).
Bruk alfanumeriske tegn, bindestreker eller understrekingstegn (maksimalt 40 tegn).
- 2 Høyreklikk, og velg positive eller negative kontrollprøver.
For å lagre en kjøring må den ha minst én positiv og én negativ kontroll.
- 3 **[Valgfritt]** Angi en prøvebeskrivelse i fanen Sample Description (Prøvebeskrivelse).
Bruk alfanumeriske tegn, bindestreker eller understrekingstegn (maksimalt 50 tegn).
- 4 **[Valgfritt]** Velg en Indeks 1-adapter fra rullegardinlisten Index 1 (Indeks 1) (i7).
Dette trinnet er valgfritt fordi indeksskombinasjonene i7 og i5 fylles ut automatisk med en standard layout.
- 5 **[Valgfritt]** Velg en Indeks 2-adapter fra rullegardinlisten Index 2 (Indeks 2) (i5).
Dette trinnet er valgfritt fordi indeksskombinasjonene i7 og i5 fylles ut automatisk med en standard layout.
- 6 Velg ikonet **Print** (Skriv ut) for å vise plateoppsettet.
- 7 Velg **Print** (Skriv ut) for å skrive ut plateoppsettet som en referanse for klargjøring av biblioteker.
- 8 **[Valgfritt]** Velg **Export** (Eksporter) for å eksportere prøveinformasjonsfilen.
- 9 Velg **Save Run** (Lagre kjøring).
Hvis du har lagt inn færre enn 24 prøver, vises vinduet Insufficient Sample (Utilstrekkelig prøve). Velg **Proceed** (Fortsett) for å fortsette, eller velg **Cancel** (Avbryt) for å redigere prøvene.



FORSIKTIG

Sekvensering med sammenslåtte biblioteker som inneholder færre enn 24 prøver, er ikke validert av Illumina.

Importere prøver

Prøveinformasjon kan importeres fra to filtyper:

- ▶ En fil med prøveinformasjon som ble eksportert tidligere fra CF Clinical Seq 2.0-modulen med funksjonen Export (Eksporter).
- ▶ En malfil, som kan genereres ved å velge **Template** (Mal) i skjermbildet Create Run (Opprett kjøring). Malfilen inneholder korrekte kolonneoverskrifter for import med plassholder-informasjon i hver kolonne. Bruk et ekstemt redigeringsprogram for å tilpasse malfilen:
 - 1 Legg til prøveinformasjon for hver prøve i kjøringen.
 - 2 Når all prøveinformasjon er lagt til, sletter du plassholder-informasjonen som står igjen i de ubrukte cellene.
 - 3 Lagre malfilen.

Slik importerer du prøveinformasjon:

- 1 Velg **Import Samples** (Importer prøver), bla deg frem til filen og velg den.
- 2 Velg 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).
Hvis du har lagt inn færre enn 24 prøver, vises vinduet Insufficient Sample (Utilstrekkelig prøve). Velg **Proceed** (Fortsett) for å fortsette, eller velg **Cancel** (Avbryt) for å redigere prøvene.

**FORSIKTIG**

Sekvensering med sammenslåtte biblioteker som inneholder færre enn 24 prøver, er ikke validert av Illumina.

Redigere en kjøring

Instruksjoner om hvordan du redigerer informasjonen i kjøringen før sekvensering, finnes i *Referanseveiledning for Local Run Manager Software for MiSeqDx (dokumentnr. 1000000011880)*.

Bibliotekklargjøring

**MERK**

Arbeidsprosessen for bibliotekklargjøring for Cystic Fibrosis 139-Variant Assay og Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay er identiske.

Hybridisering av oligonukleotidsammenslåing

Forbruksmaterieill

- ▶ 96-brønners PCR-plate
- ▶ Prøver med genomisk DNA (gDNA)
- ▶ Hybridiseringsbuffer
- ▶ Positiv kontrollprøve
- ▶ Oligosammenslåing for cystisk fibrose
- ▶ TE-buffer
- ▶ Klebende aluminiumsfolieforsegling

Klargjøring

1 Klargjør følgende forbruksmaterieill:

Reagens	Oppbevaring	Instruksjoner
Hybridiseringsbuffer	-25 °C til -15 °C	La nå romtemperatur. Roter kraftig for å sikre at alt bunnfall er fullstendig oppløst, og deretter sentrifugeres rørene et øyeblikk for å samle væske.
Oligosammenslåing for cystisk fibrose	-25 °C til -15 °C	La nå romtemperatur. Roter kraftig for å sikre at alt bunnfall er fullstendig oppløst, og deretter sentrifugeres rørene et øyeblikk for å samle væske.

- 2 La gDNA-prøver og positiv kontrollprøve nå romtemperatur.
- 3 Still inn en 96-brønners varmeblokk på 95 °C.
- 4 Forvarm en inkubator til 37 °C.

Prosedyre

- 1 Merk en ny 96-brønners PCR-plate med HYB.
- 2 Opprett prøveplaten i henhold til plategrafikken som er skrevet ut fra Local Run Manager.
- 3 Følg plateoppsettet som er generert fra Local Run Manager, og tilsett 5 µl negativ kontroll (f.eks. TE-buffer) i aktuell brønn i HYB-platen.
- 4 Tilsett 5 µl prøve eller kontroll i 50 ng/µl (250 ng totalt) i de aktuelle brønnene i HYB-platen.
- 5 Tilsett 5 µl oligosammenslåing for cystisk fibrose i hver prøvebrønn.
- 6 Tilsett 40 µl hybridiseringsbuffer i hver prøve i HYB-platen.
- 7 Pipetter forsiktig opp og ned 3–5 ganger for å blande.
- 8 Forsegl HYB-platen, og sentrifuger ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 9 Legg HYB-platen på den forhåndsoppvarmede blokken ved 95 °C, og inkuber i 1 minutt.
- 10 Reduser varmeblokken til 40 °C, og fortsett å inkubere til varmeblokken når 40 °C (~80 minutter).

Gradvis nedkjøling er kritisk for riktig hybridisering.

SIKKERT STOPPEPUNKT

Når varmeblokken har nådd 40 °C, er HYB-platen stabil ved 40 °C i 2 timer.

Fjerning av ubundne oligonukleotider

Forbruksmaterieill

- ▶ Ekstensjonsligasjonsblanding
- ▶ Filterplate
- ▶ Stringent vaskebuffer
- ▶ Universalvaskebuffer
- ▶ MIDI-plate

Klargjøring

1 Klargjør følgende forbruksmaterieill:

Reagens	Oppbevaring	Instruksjoner
Ekstensjonsligasjonsblanding	-25 °C til -15 °C	La nå romtemperatur. Roter for å blande.
Stringent vaskebuffer	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur. Roter kraftig. Kontroller at alt bunnfall er oppløst.
Universalvaskebuffer	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur. Roter for å blande.

2 Sett sammen filterplateenheten (FPU) *fra øverst til nederst*:

- Lokk
- Filterplate
- Adapterkrage
- MIDI-plate

3 Forvask filterplatemembranen på følgende måte.

- a Tilsett 45 µl stringent vaskebuffer i hver brønn.
- b Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 5 minutter.

4 Kontroller at alle brønner i filterplaten dreneres helt. Hvis vaskebufferen ikke dreneres helt, sentrifugerer du på nytt ved 2400 × g ved 20 °C til all væsken har gått gjennom (ytterligere 5–10 minutter).



FORSIKTIG

Det er avgjørende å styre sentrifugetemperaturen under vasketrinnene. Hvis temperaturen når 25 °C eller høyere, kan den høyere temperaturen føre til høyere stringens i primerbinding. Hvis prøver har SNV-er i primerbindingsregionene, kan den høyere stringensen i sjeldne tilfeller føre til alleutfall.

Prosedyre

- 1 Fjern HYB-platen fra varmeblokken, og sentrifuger ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 2 Bruk en dråpeteller med flere kanaler stilt inn på 55 µl, og overfør hele volumet for hver prøve til de tilsvarende brønnene i filterplaten.
- 3 Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 5 minutter.
- 4 Vask filterplaten på følgende måte.

- a Tilsett 45 µl stringent vaskebuffer i hver prøvebrønn.
 - b Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 5 minutter.
- 5 Vask platen **en gang til**.
 - 6 Hvis vaskebufferen ikke dreneres helt, sentrifugerer du på nytt ved 2400 × g ved 20 °C til all væsken er drenert (ytterligere 5–10 minutter).
 - 7 Kast alt som flyter gjennom, og sett deretter sammen FPU på nytt.
 - 8 Tilsett 45 µl universalvaskebuffer i hver prøvebrønn.
 - 9 Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 10 minutter.
 - 10 Kontroller at all væske er drenert etter sentrifugering. Gjenta sentrifugering ved behov.

Ekstensjonsligasjon av bundne oligonukleotider

Forbruksmaterieill

- ▶ Ekstensjonsligasjonsblanding
- ▶ Klebende aluminiumsfolieforsegling

Prosedyre

- 1 Tilsett 45 µl ekstensjonsligasjonsblanding i hver prøvebrønn på filterplaten.
- 2 Forsegl filterplaten, og dekk deretter til med lokket.
- 3 Inkuber FPU i den forhåndsoppvarmede inkubatoren ved 37 °C i 45 minutter.
- 4 Mens FPU-platen inkuberer, klargjøres AMP (forsterkningsplaten) som beskrevet i følgende del.

PCR-forsterkning

Forbruksmaterieill

- ▶ 96-brønners PCR-plate
- ▶ PCR-plateforsegling
- ▶ Indeksprimere (A501–A508 og A701–A712)
- ▶ 10 N NaOH
- ▶ PCR-hovedblanding
- ▶ PCR-polymerase
- ▶ 15 ml kjegleformet rør

Klargjøring

- 1 Bestem hvilke indeksprimere som skal brukes i henhold til det grafiske plateoppsettet i Local Run Manager.
- 2 Klargjør følgende forbruksmaterieill:

Reagens	Oppbevaring	Instruksjoner
Indeksprimere (A501–A508 og A701–A712)	–25 °C til –15 °C	La nå romtemperatur. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
PCR-polymerase	–25 °C til –15 °C	La ligge i fryser til den trengs for å klargjøre PCR-arbeidsløsning.
PCR-hovedblanding	–25 °C til –15 °C	La nå romtemperatur. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

- 3 Klargjør ny 0,05 N NaOH ved å tilsette 25 µl 10 N NaOH i 4975 µl RNase/DNase-fritt vann.
- 4 Merk en ny 96-brønners PCR-plate med AMP.
- 5 Tilsett indeksprimere i AMP-platen på følgende måte.

- a Tilsett 4 µl av de valgte indeks 2-primere (A501–A508) i den aktuelle brønnen i AMP-platen.
- b Kast de opprinnelige hvite hettene, og sett deretter på nye hvite hetter.
- c Tilsett 4 µl av de valgte indeks 1-primere (A701–A712) i den aktuelle raden i AMP-platen.
- d Kast de opprinnelige oransje hettene, og sett deretter på nye oransje hetter.

6 Klargjør følgende forbruksmateriell:

Reagens	Oppbevaring	Instruksjoner
PCR-polymerase	–25 °C til –15 °C	Ta ut av oppbevaring, og sentrifuger et kort øyeblikk. Gå umiddelbart videre til neste trinn. Hvis PCR-polymerase skal brukes til ytterligere klargjøringer, settes den tilbake til oppbevaring etter at PCR-arbeidsløsning er laget.

7 Klargjør PCR-arbeidsløsningen på følgende måte.



MERK

Instruksjonene nedenfor omfatter volumer som er nødvendige for å behandle 96 prøver. Hvis færre prøver skal behandles, justerer du volumer deretter for ikke å bruke mer reagens enn nødvendig.

- a For 96 prøver tilsettes 56 µl PCR-polymerase i 2,8 ml PCR-hovedblanding.
- b Bland ved å vende 20 ganger.

PCR-arbeidsløsningen er stabil ved romtemperatur i 10 minutter.

Prosedyre

- 1 Fjern FPU fra inkubatoren, og fjern deretter forseglingen.
- 2 Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger deretter ved 2400 × g ved 20 °C i 2 minutter.
- 3 Tilsett 25 µl 0,05 N NaOH i hver brønn i filterplaten.
- 4 Pipetter opp og ned 5–6 ganger.
- 5 Dekk til filterplaten med lokket, og inkuber ved romtemperatur i 5 minutter.
- 6 Mens filterplaten inkuberes, overføres 22 µl PCR-hovedblanding i hver brønn i AMP-platen som inneholder indeksprimere.
- 7 Overfør prøver som er eluert fra filteret til AMP-platen på følgende måte.
 - a Pipetter prøvene i den første kolonnen i filterplaten opp og ned 5–6 ganger.
 - b Overfør 20 µl fra filterplaten til den tilsvarende kolonnen i AMP-platen.
 - c Pipetter forsiktig opp og ned 5–6 ganger for grundig å kombinere DNA med PCR-hovedblandingen.
 - d Gjenta overføringstrinn for resten av kolonnene fra filterplaten til AMP-platen.
- 8 Forsegl AMP-platen, og sikre den med en gummivalse.
- 9 Sentrifuger ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 10 Overfør AMP-platen til postforsterkningsområdet.
- 11 Utfør PCR ved hjelp av følgende program på en termosyklar:
 - ▶ 95 °C i 3 minutter
 - ▶ 25 sykluser på:
 - ▶ 95 °C i 30 sekunder
 - ▶ 62 °C i 30 sekunder
 - ▶ 72 °C i 60 sekunder
 - ▶ 72 °C i 5 minutter
 - ▶ Holdes på 10 °C

SIKKERT STOPPEPUNKT

Hvis du ikke fortsetter umiddelbart til PCR-rengjøring, kan AMP-platen bli på termosykleren over natten eller oppbevares ved 2 °C til 8 °C i opptil 48 timer.

PCR-rengjøring**Forbruksmateriell**

- ▶ 50 ml kjegleformet rør
- ▶ Klebende plateforseglinger til engangsbruk
- ▶ To MIDI-plater
- ▶ Elueringsbuffer
- ▶ PCR-rengjøringskuler

Klargjøring

- 1 Klargjør følgende forbruksmateriell:

Reagens	Oppbevaring	Instruksjoner
PCR-rengjøringskuler	2 °C til 8 °C	La stå i 30 minutter for å oppnå romtemperatur.

- 2 For 96 prøver klargjøres ny 80 % EtOH ved hjelp av 36 ml absolutt EtOH og 9 ml DNase/RNase-fritt vann. Bland grundig.

**MERK**

Hvis færre enn 96 prøver skal behandles, justeres volumer deretter for ikke å bruke mer reagens enn nødvendig.

Prosedyre

- 1 Sentrifuger AMP-platen ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 2 Merk en ny MIDI-plate med CLP.
- 3 Snu PCR-rengjøringskulene ti ganger. Roter kraftig, og snu deretter ytterligere ti ganger. Kontroller oppløsningen visuelt for å kontrollere at kulene er resuspendert.
- 4 Tilsett 45 µl PCR-rengjøringskuler i hver brønn i CLP-platen.
- 5 Overfør hele PCR-produktet fra hver brønn i AMP-platen til tilsvarende brønn i CLP-platen.
- 6 Forsegle og rist den på en mikroplateryster ved 1800 o/min i 2 minutter.
- 7 Inkuberes ved romtemperatur uten risting i 10 minutter.
- 8 Sett platen på et magnetstativ, og vent til væsken er klar (~2 minutter).
- 9 Mens CLP-platen står på magnetstativet, fjernes supernatanten forsiktig og kastes.
- 10 Vask kuler på følgende måte.
 - a La dem stå på magnetstativet, og tilsett 200 µl ny 80 % EtOH i hver brønn.
 - b Vent minst 30 sekunder, eller til supernatanten er klar.
 - c Fjern og kast all supernatant fra hver brønn.
- 11 Vask kulene en **andre** gang.
- 12 Bruk et P20 flerkanalsdråpetellersett satt på 20 µl til å fjerne overflødig EtOH.
- 13 Ta CLP-platen ut av magnetstativet, og lufttørk kulene i 10 minutter.
- 14 Tilsett 30 µl elueringsbuffer i hver prøve.
- 15 Forsegle CLP-platen, og rist den på en mikroplateryster ved 1800 o/min i 2 minutter. Etter risting må du kontrollere at prøvene ble resuspendert. Hvis ikke gjentar du dette trinnet.
- 16 Inkuberes i romtemperatur i 2 minutter.
- 17 Sett CLP-platen på magnetstativet, og vent til supernatanten er klar (~2 minutter).

- 18 Merk en ny MIDI-plate med LNP.
- 19 Overfør 20 µl supernatant fra hver brønn i CLP-platen til tilsvarende brønn i LNP-platen.
- 20 **[Valgfritt]** Overfør gjenværende 10 µl av supernatanten fra CLP-platen til en ny plate, og merk platen med et kjøringsnavn og dato. Oppbevar denne platen ved -25 °C til -15 °C til sekvenseringskjøringen og dataanalysen er ferdig. De rengjorte PCR-produktene kan brukes til feilsøking hvis det oppstår prøvefeil.

SIKKERT STOPPEPUNKT

Hvis den stopper på dette punktet, forsegles LNP-platen og sentrifugeres ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt. Platen er stabil i opptil tre timer ved 2 °C til 8 °C.

Biblioteknormalisering og -sammenslåing

Forbruksmaterieill

- ▶ 15 ml kjegleformet rør
- ▶ 96-brønners PCR-plate
- ▶ Mikrosentrifugerør
- ▶ Bibliotekkuler
- ▶ Bibliotekfortynningsbuffer
- ▶ Biblioteknormaliseringsfortynner
- ▶ Vaskeløsning for biblioteknormalisering
- ▶ 10 N NaOH
- ▶ RNase/DNase-fritt vann

Klargjøring

- 1 Klargjør følgende forbruksmaterieill:

Reagens	Oppbevaring	Instruksjoner
Bibliotekkuler	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.
Bibliotekfortynningsbuffer	-25 °C til -15 °C	La nå romtemperatur. Roter kraftig. Kontroller at alt bunnfall er oppløst.
Biblioteknormaliseringsfortynner	-25 °C til -15 °C	La nå romtemperatur. Roter kraftig. Kontroller at alt bunnfall er oppløst.
Vaskeløsning for biblioteknormalisering	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur. Roter kraftig.

- 2 Klargjør ny 0,1 N NaOH ved å tilsette 50 µl 10 N NaOH i 4950 µl RNase/DNase-fritt vann.

Prosedyre

- 1 Bland biblioteknormaliseringsfortynner og bibliotekkuler i et nytt 15 ml kjegleformet rør på følgende måte.



MERK

Instruksjonene nedenfor omfatter volumer som er nødvendige for å behandle 96 prøver. Hvis færre prøver skal behandles, justerer du volumer deretter for ikke å bruke mer reagens enn nødvendig.

- a For 96 prøver tilsettes 4,4 ml biblioteknormaliseringsfortynner.
- b Roter bibliotekkuler kraftig i ett minutt med vekselvis vending til kulene er resuspendert og ingen pellet finnes på bunnen av røret når røret er vendt opp ned.
- c Pipetter bibliotekkuler opp og ned 10 ganger for å resuspendere.



FORSIKTIG

Det er ekstremt viktig at bibliotekkulpelletter på bunnen av røret blir fullstendig resuspendert. Bruk av en P1000 sikrer at kulene blir homogent resuspendert og at det ikke finnes kulemasse på bunnen av røret. Dette er avgjørende for å oppnå konsekvent klyngetetthet på strømningscellen.

- d For 96 prøver pipetteres 800 µl bibliotekkuler i det kjegleformede røret som inneholder biblioteknormaliseringsfortynner.
 - e Bland ved å snu røret 15–20 ganger.
- 2 Tilsett 45 µl av arbeidsløsningen av biblioteknormaliseringsfortynner/bibliotekkuler i hver brønn i LNP-platen.
 - 3 Forsegle og rist den på en mikroplateryster ved 1800 o/min i 30 minutter.



MERK

Hvis sekvensering skal utføres samme dag, må du begynne å tine reagenskassetten nå. Følg instruksjonene for å tine MiSeqDx-reagenskassetten i delen som heter *Klargjøre for biblioteksekvensering på side 31*.

- 4 Sett LNP-platen på magnetstativet, og vent til væsken er klar (~2 minutter).
- 5 Mens LNP-platen står på magnetstativet, fjernes supernatanten forsiktig og kastes.
- 6 Fjern LNP-platen fra magnetstativet, og vask kuler med vaskeløsning for biblioteknormalisering på følgende måte:
 - a Tilsett 45 µl vaskeløsning for biblioteknormalisering i hver prøvebrønn.
 - b Forsegle LNP-platen, og rist den på en mikroplateryster ved 1800 o/min i 5 minutter.
 - c Sett platen på et magnetstativ i minst 2 minutter eller til supernatanten er klar.
 - d Fjern supernatanten forsiktig, og kast den.
- 7 Gjenta prosedyren for vaskeløsning for biblioteknormalisering som beskrevet i tidligere trinn.
- 8 Bruk et P20 flerkanalsdråpetellersett satt til 20 µl til å fjerne overflødig vaskeløsning for biblioteknormalisering.
- 9 Fjern LNP-platen fra magnetstativet, og tilsett deretter 30 µl 0,1 N NaOH i hver brønn.
- 10 Forsegle LNP-platen, og rist den på en mikroplateryster ved 1800 o/min i 5 minutter.
- 11 Under elueringen på 5 minutter merker du en ny 96-brønners PCR-plate med SGP.
- 12 Tilsett 30 µl biblioteklagringsbuffer i hver brønn.
- 13 Kontroller at alle prøver i LNP-platen er fullstendig resuspendert. Hvis prøvene ikke er fullstendig resuspendert, skal prøven pipetteres forsiktig opp og ned. Bank eventuelt platen forsiktig mot benken, og rist deretter i ytterligere 5 minutter.
- 14 Sett LNP-platen på magnetstativet i minst 2 minutter.
- 15 Bruk en dråpeteller med flere kanaler som er stilt inn på 30 µl, og overfør supernatanten fra LNP-platen til SGP-platen. Pipetter forsiktig opp og ned 5 ganger for å blande.
- 16 Forsegle SGP-platen, og sentrifuger deretter ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 17 Roter bibliotekfortynningsbufferen, og kontroller at alt bunnfall er fullstendig oppløst. Sentrifuger et øyeblikk for å samle innhold.
- 18 Merk et nytt mikrosentrifugerør med PAL.
- 19 Bestem hvilke prøver som skal grupperes for sekvensering. Maksimalt 96 prøver kan grupperes for sekvensering.
- 20 Overfør 5 µl av hvert bibliotek som skal sekvenseres, fra hver brønn i SGP-platen kolonne for kolonne til den tilsvarende brønnen i åtterørs PCR-strimmelen.
- 21 Overfør innholdet i åtterørs PCR-strimmelen til PAL-røret. Roter PAL-røret til alt er godt blandet.
- 22 Forsegle SGP-platen med en klebende plateforsegling, og merk med kjøringsnavn og dato.

**MERK**

SGP-platen kan oppbevares ved -25 °C til -15 °C i opptil 3 dager og brukes til å slå sammen biblioteker på nytt ved behov.

- 23 Merk 2–3 nye mikrosentrifugerør med DAL.
- 24 Tilsett 585 μl bibliotekfortynningsbuffer i DAL-rørene.
- 25 Overfør 9 μl PAL til hvert DAL-rør som inneholder bibliotekfortynningsbuffer.
- 26 Pipetter opp og ned 3–5 ganger for å skylle spissen og for å sikre at overføringen er fullstendig.

SIKKERT STOPPEPUNKT

Hvis sekvensering på MiSeqDx ikke skal utføres umiddelbart, kan DAL-rørene oppbevares ved -25 °C til -15 °C i opptil 28 dager.

Biblioteksekvensering

**MERK**

Arbeidsprosessen for biblioteksekvensering for Cystic Fibrosis 139-Variant Assay og Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay er identiske.

Klargjøre for biblioteksekvensering

Forbruksmaterieill

- ▶ MiSeqDx Reagent Kit v3 eller MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro
- ▶ Bibliotekfortynningsbuffer
- ▶ PhiX-internkontrollbibliotek

Klargjøring

- 1 Still inn en varmeblokk som rommer 1,5 ml sentrifugerør, på 96 °C .
- 2 Klargjør et isbad i en isbøtte.
- 3 Klargjør følgende forbruksmaterieill:

Reagens	Oppbevaring	Instruksjoner
Bibliotekfortynningsbuffer	-25 °C til -15 °C	Tin ved romtemperatur. Roter for å blande. Kontroller at alt bunnfall er oppløst. Sentrifuger et kort øyeblikk, og plasser i isvann. MiSeqDx Reagent Kit v3 inneholder ekstra bibliotekfortynningsbuffer ved behov.
PhiX-internkontroll	-25 °C til -15 °C	Tin ved romtemperatur. Plasser i isvann.
MiSeqDx Reagent Kit v3-kasset	-25 °C til -15 °C	La reagenskassetten tine i vannbad ved romtemperatur i ca. 90 minutter eller til den er helt tint. Du finner mer informasjon om klargjøring av reagenskassetter i Referanseveiledning for MiSeqDx-instrumentet for MOS v2 (dokumentnr. 100000021961).
MiSeqDx-strømningscelle	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur. Du finner mer informasjon om klargjøring av strømningsceller i Referanseveiledning for MiSeqDx-instrumentet for MOS v2 (dokumentnr. 100000021961).
MiSeqDx SBS Solution (PR2)	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur. Du finner mer informasjon om klargjøring av SBS-løsning i Referanseveiledning for MiSeqDx-instrumentet for MOS v2 (dokumentnr. 100000021961).

Denaturere og fortynne PhiX-internkontroll

Forbruksmaterieill

- ▶ DNase/RNase-fritt vann
- ▶ 10 N NaOH
- ▶ Bibliotekfortynningsbuffer
- ▶ PhiX-internkontrollbibliotek
- ▶ TE-buffer
- ▶ 15 ml kjegleformet rør
- ▶ Mikrosentrifugerør

Klargjøring

- 1 I et kjegleformet rør kombinerer du følgende volumer for å klargjøre 0,1 N NaOH:
 - ▶ DNase/RNase-fritt vann (2475 µl)
 - ▶ Arbeidsløsning av 10 N NaOH (25 µl)
- 2 Snu røret flere ganger for å blande.



FORSIKTIG

Det er avgjørende å bruke nyfortynnet NaOH for fullstendig å denaturere prøver for klyngegenerering på MiSeqDx.

Hvis PhiX klargjøres samme dag som biblioteknormalisering, kan samme stamløsning av 0,1 N NaOH brukes.

- 3 Kombiner følgende volumer for å fortynne PhiX-internkontrollbiblioteket til 2 nM:
 - ▶ 10 nM PhiX-internkontrollbibliotek (2 µl)
 - ▶ 1X TE Buffer (8 µl)
- 4 Kombiner følgende volumer for å klargjøre et 1 nM PhiX-internkontrollbibliotek:
 - ▶ 2 µl nM PhiX-internkontrollbibliotek (10 µl)
 - ▶ 0,1 N NaOH (10 µl)
- 5 Roter et kort øyeblikk for å blande.
- 6 Sentrifuger 1 nM PhiX-internkontroll ved 280 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 7 Inkuber i 5 minutter ved romtemperatur for å denaturere PhiX-internkontrollbiblioteksløsningen til enkle strenger.
- 8 I et nytt mikrosentrifugerør kombinerer du følgende volumer for å klargjøre et 20 pM PhiX-internkontrollbibliotek:
 - ▶ Denaturert PhiX-internkontrollbibliotek (2 µl)
 - ▶ Forhånds kjølt bibliotekfortynningsbuffer (98 µl)



FORSIKTIG

Det denaturerte PhiX-internkontrollbiblioteket på 20 pM kan oppbevares i opptil tre uker ved -25 °C til -15 °C som alikvoter for engangsbruk.

Klargjøre prøver for sekvensering

- 1 Fortsett med ett DAL-rør for sekvensering.
- 2 Hvis DAL-røret ble oppbevart frosset, må det tine helt. Deretter blander du ved å pipettere opp og ned.
- 3 Hvis 20 pM PhiX-internkontroll ble oppbevart frosset, tar du ut en alikvot til engangsbruk, tiner den helt, blander ved å rotere, og deretter sentrifugerer du et kort øyeblikk.
- 4 Tilsett 6 µl 20 pM PhiX-internkontroll i DAL-røret.
- 5 Pipetter opp og ned 3–5 ganger for å skylle spissen, og kontroller at overføringen fullføres.
- 6 Bland DAL-røret ved å rotere røret med topphastighet.
- 7 Sentrifuger DAL-røret ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 8 Inkuber DAL-røret på en varmeblokk ved 96 °C i 2 minutter.

- 9 Etter inkubasjonen vendes DAL-røret 1–2 ganger for å blande, og deretter settes det umiddelbart i isvann.
- 10 La DAL-røret (sammenslåtte biblioteker) stå i isvann i 5 minutter.

Laste sammenslåtte biblioteker på kassett

- 1 Ved hjelp av en ny 1 ml dråpetellerspiss stikker du hull på folieforseglingen over brønnen i reagenskassetten som er merket Load Samples (Last inn prøver).
- 2 Pipetter 600 µl fra DAL-røret i brønnen Load Samples (Last inn prøver). Unngå å ta på folieforseglingen.
- 3 Kontroller om det er luftbobler i brønnen etter at du har lastet inn prøve. Hvis du oppdager luftbobler, dunker du kassetten forsiktig mot benken for å sprekke boblene.
- 4 Gå direkte til kjøringssoppsettrinnene ved hjelp av grensesnittet i MiSeq Operating Software (MOS). Du finner mer informasjon om kjøringssoppsett på MiSeqDx i *Referanseveiledning for MiSeqDx-instrumentet for MOS v2* (dokumentnr. 1000000021961).

Etter kjøring-vask med malslangevask

Etter sekvensering anbefales det på det sterkeste å utføre en etter kjøring-vask med malslangevask.



FORSIKTIG

Hvis malslangevasken ikke utføres, kan betegnelsesfrekvenser for negativ kontroll påvirkes i påfølgende kjøring.



MERK

Etter kjøring-vaskearbeidsprosessen for Cystic Fibrosis 139-Variant Assay og Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay er identiske.

Forbruksmaterieill

- ▶ Mikrosentrifugerør
- ▶ Vann av laboratoriekvalitet
- ▶ Tween 20
- ▶ 5 % natriumhypokloritt
- ▶ MiSeq-rør



ADVARSEL

Dette reagenssettet inneholder potensielt farlige kjemikalier. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk verneutstyr, inkludert vernebriller, hansker og laboratoriefrakk som er egnet ved risiko for eksponering. Brukte reagenser skal behandles som kjemisk avfall og kastes i samsvar med gjeldende regionale, nasjonale og lokale lover og forskrifter. Du finner mer informasjon knyttet til helse, miljø og sikkerhet i sikkerhetsdatabladet på support.illumina.com/sds.html.

Klargjøring

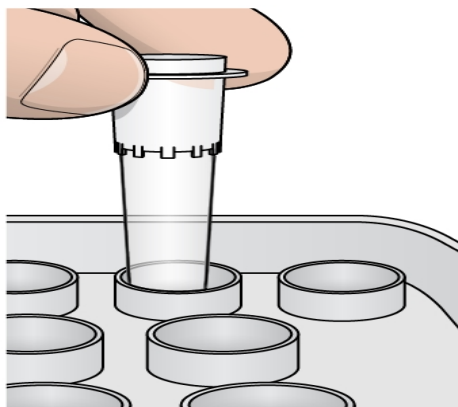
- 1 Klargjør ny vaskeløsning med Tween 20 og vann av laboratoriekvalitet på følgende måte.
 - a Tilsett 5 ml 100 % Tween 20 i 45 ml vann av laboratoriekvalitet. Disse volumene gir 10 % Tween 20.
 - b Tilsett 25 ml 10 % Tween 20 i 475 ml vann av laboratoriekvalitet. Disse volumene gir en 0,5 % Tween 20-vaskeløsning.
 - c Bland ved å vende fem ganger.
- 2 Klargjør ny natriumhypoklorittvaskeløsning med vann av laboratoriekvalitet på følgende måte.

- a Tilsett 36 µl 5 % natriumhypokloritt i 864 µl vann av laboratoriekvalitet. Disse volumene gir en 1:25 natriumhypoklorittfortynning.
 - b Tilsett 50 µl 1:25 natriumhypoklorittfortynning i 950 µl vann av laboratoriekvalitet i et MiSeq-rør.
- 3 Det er viktig å bruke natriumhypokloritt med riktig konsentrasjon. Kontroller prosentandelen natriumhypokloritt på produktetiketten. Hvis konsentrasjonen er for høy, kan det føre til at klyngegenerering mislykkes i påfølgende kjøring. Hvis 5 % natriumhypokloritt ikke er tilgjengelig, lager du en 1 ml løsning av 0,01 % natriumhypokloritt i vann av laboratoriekvalitet. Ikke bruk natriumhypokloritt som en vedlikeholdsvask eller en reservevask.
 - 4 Klargjør vaskekomponentene med ny vaskeløsning på følgende måte.
 - a Tilsett 6 ml vaskeløsning i hver brønn på vaskebrettet.
 - b Tilsett 350 ml vaskeløsning i vaskeflasken på 500 ml.

Prosedyre

- 1 Sett MiSeq-røret som inneholder 0,01 % natriumhypoklorittvaskeløsning, i posisjon 17 på vaskebrettet til rørets hals er i flukt med brettet.
Røret fortrenger Tween 20- og vaskeløsningen med vann av laboratoriekvalitet fra posisjon 17.

Figur 2 MiSeq-rør i posisjon 17 på vaskebrettet



FORSIKTIG

Sørg for at MiSeq-røret med natriumhypokloritt kun settes inn i brettposisjon 17. Hvis du setter røret inn i en annen posisjon, kan klyngegenerering mislykkes i påfølgende kjøring.

- 2 Når kjøringen er fullført, velger du **Start Wash** (Start vask).
Programvaren løfter sugeenhetene i reagenskjøleren.
- 3 Velg **Perform optional template line wash** (Utfør valgfri malslangevask) på skjermbildet Post-Run Wash (Etter kjøring-vask).
- 4 Åpne reagenskammerdøren og reagenskjølerdøren, og skyv deretter den brukte reagenskassetten ut av kjøleren.
- 5 Skyv vaskebrettet inn i reagenskjøleren til det stopper, og lukk deretter reagenskjølerdøren.
- 6 Løft sugeenhetens håndtak foran MiSeqDx SBS-løsningsflasken og avfallsflasken til det låses på plass.
- 7 Ta bort MiSeqDx SBS-løsningsflasken, og erstatt den med vaskeflasken.
- 8 Ta bort avfallsflasken, og kast innholdet på riktig måte. Sett avfallsflasken tilbake i reagenskammeret.
- 9 Senk sugeenhetens håndtak sakte ned. Kontroller at sugeenhetene senkes ned i vaskeflasken og avfallsflasken.
- 10 Lukk reagenskammerdøren.
- 11 Velg **Next** (Neste). Etter kjøring-vasken begynner.
- 12 Når vasken er fullført, lar du den brukte strømningscellen, vaskebrettet og vaskeflasken, som inneholder resten av vaskeløsningen, bli i instrumentet.

- 13 Sugeenhetene forblir nede, noe som er normalt. La den ubrukke vaskeløsningen bli i vaskebrettet og vaskeflasken for å forhindre at sugeenhetene tørker ut og at det kommer luft inn i systemet.

Ny analyse av sekvenserte biblioteker

Etter en sekvenseringskjøring kan ny analyse av samme sekvenseringsdatasett utføres ved å følge prosedyren *Sett analyse tilbake i kø i Referanseveiledning for Local Run Manager Software for MiSeqDx (dokumentnr. 100000011880)*. Å sette analyse tilbake i kø er begrenset til modulen som opprinnelig ble brukt til å utføre sekvensering. Å sette analyse tilbake i kø vil tillate redigeringer av prøveinformasjon og generere nye rapporter.



MERK

Sammenslåtte biblioteker brukt for sekvensering må ha 24–96 prøver. Rapporter for et delsett med prøver kan oppnås ved å angi færre prøver under oppsett av å sette tilbake i kø. Rapporter vil kun bli generert for prøver som angis under oppsett av å sette tilbake i kø.

Alternativer for ny test av sammenslåtte biblioteker

TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay bruker samme arbeidsprosess for bibliotekklargjøring som TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay. Prosedyren for bibliotekklargjøring krever at det velges en analyse før start. I tilfeller der sammenslåtte biblioteker (DAL-rør) krever ytterligere testing (f.eks. gjentakelse av en sekvenseringskjøring eller reflekstesting med en annen TruSight CF Assay), kan imidlertid DAL-rør brukes etter behov uten å gjenta bibliotekklargjøring. Følg prosedyren nedenfor for å teste på nytt:



MERK

Sammenslåtte biblioteker for sekvensering må ha minst 24–96 prøver. Rapporter for et delsett med prøver kan oppnås ved å angi færre prøver under oppsett av sekvenseringskjøring. Alle sammenslåtte prøver vil bli sekvensert, men rapporter vil kun bli generert for prøver som er angitt under oppsett av sekvenseringskjøring.

- 1 Konfigurer kjøring ved hjelp av instruksjoner i *Analysevalg og kjøringoppsett på side 20*.
- 2 Sekvenser biblioteker ved å følge instruksjoner i *Biblioteksekvensering på side 31*.
- 3 Når sekvenseringskjøring er fullført, vasker du MiSeqDx ved å følge instruksjoner i *Etter kjøring-vask med malslangevask på side 33*.

Tolkning av resultater av Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

- ▶ Cystic Fibrosis 139-Variant Assay er utformet for å påvise 139 CFTR-varianter, inkludert de som anbefales av ACMG (*Tabell 2*).
- ▶ Analyserapporter oppgir prøvenavnene og genotypen for hver påvist variant for en prøve.
 - ▶ Alle prøver undersøkes for 134 CF-fremkallende varianter og den ACMG-anbefalte R117H-varianten. Kun påviste mutante alleler oppgis i analyserapporten.
 - ▶ PolyTG/PolyT-varianten rapporteres kun hvis R117H-variasjonen identifiseres for en prøve. Når det gjelder pasienter med en R117H-variant, skal det utføres ytterligere testing for å bestemme om en PolyTG/PolyT-variant, som kan påvirke den kliniske fenotypen [f.eks. 12-13 (TG) eller 5T] er i cis/trans-retning i forhold til R117H-varianten.



MERK

PolyTG/PolyT-genotypen bestemmes av Cystic Fibrosis 139-Variant Assay basert på avleste tellinger av de vanligste genotypene. På grunn av neste generasjons sekvenserings digitale natur, er analysen i stand til å oppnå høy nøyaktighet fra flere observasjoner sammenlignet med andre sekvenseringsbaserte teknologier som kun bruker noen få observasjoner.

- ▶ Når en prøve har homozygot F508del- eller I507del-genotype, rapporteres dette for prøven hvis én eller flere av de tre godartede polymorfismene I506V, I507V og F508C er påvist. Hvis alle tre godartede polymorfismer er av villtype, indikerer rapporten at I506V-, I507V- og F508C-varianter ikke finnes for prøven.

**MERK**

Fordi dette er en sekvenseringsbasert analyse, er det ikke noen interferens med F508del- eller I507del-rapportering for de tre godartede polymorfismene. Derfor vil det ikke bli gjort noen korrigeringer av det påviste resultatet.

- ▶ Når en prøve blir identifisert som heterozygot og både villtype og mutante alleler blir påvist for prøven, rapporteres genotyperesultatet som HET.
- ▶ Når en prøve blir identifisert som homozygot og kun den mutante allelen blir påvist for prøven, rapporteres genotyperesultatet som HOM.
- ▶ Hvis ingen variant blir identifisert for en prøve, indikerer rapporten at ingen panelvarianter er påvist.
- ▶ Analyserapporten gir informasjon om prøvebetegnelsesfrekvens for hver prøve. Betegnelsesfrekvens beregnes som antall variantposisjoner/-regioner som oppfyller en forhåndsdefinert konfidensverditerskel, dividert med det totale antallet posisjoner/regioner i spørningen.
 - ▶ For prøver som krever betinget rapportering, tas det også hensyn til de ytterligere variantene det spørres etter, i beregningen av betegnelsesfrekvens.
 - ▶ Alle varianter med en forhåndsdefinert konfidensverdi under terskelen rapporteres som ingen betegnelse. Det anbefales at prøven gjentas.
- ▶ Et prøveresultat anses kun som gyldig hvis betegnelsesfrekvensen er $\geq 99\%$. Hvis betegnelsesfrekvensen er $< 99\%$, rapporteres ytelsen som ikke bestått, og prøven må gjentas.

**MERK:**

Hvis betegnelsesfrekvensen er $< 50\%$, vil ytelsen bli rapportert som ikke bestått, og en kommentar om at prøven mislyktes, er angitt på rapporten. Variantinformasjon vises ikke. Prøven må gjentas.

- ▶ Det anbefales at varianter som ble validert ved hjelp av syntetiske prøver (se Nøyaktighetstabell), verifiseres av brukeren ved hjelp av en validert referansemetode før rapportering av det første pasientresultatet med disse variantene.
- ▶ Hvis mer enn to varianter er identifisert for en prøve, anbefales det at brukeren verifiserer resultatet ved å gjenta prøven ved hjelp av TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay med et ferskt gDNA-ekstrakt for å utelukke krysskontaminasjon av prøven.

**MERK**

Haplotyfefasing skal vurderes når det påvises to eller flere varianter.

- ▶ Alle varianttolkninger skal utføres av en godkjent molekylær genetiker eller tilsvarende i henhold til lokale prosedyrer og retningslinjer.¹⁵ Potensielle tolkningsreferanser inkluderer, men er ikke begrenset til: CFTR2-database,¹¹ Sosnay-publikasjon,¹³ ACMG-retningslinjer fra 2004¹ og ACOG-komiteens meninger fra 2011.² Du finner informasjon om hvordan resultater beregnes og presenteres, samt en beskrivelse av innholdet i tekstfilrapport, i retningslinjene for analyseprogramvaren som er installert på MiSeqDx. Du finner informasjon om Local Run Manager i *Referanseveiledning for Local Run Manager Software for MiSeqDx (dokumentnr. 100000011880)* og *Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager CF 139-Variant 2.0 Analysis Module (dokumentnr. 1000000100945)*.

Tolkning av resultater av Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay er utformet for å sekvensere alle proteinkodingsregioner i CFTR-genet over de 27 eksonene, 5–30 baser flankerende intronsekvens, ~100 nt flankerende sekvens ved 5' og 3' UTR og to dype intronmutasjoner (1811+1,6kbA>G, 3489+10kbC>T). De nøyaktige sekvenserte regionene er

oppgitt i **Tabell 3**. I tillegg rapporterer analysen om PolyTG/PolyT-varianten og to store deleasjoner (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23).

- ▶ Analyserapporter oppgir prøvenavnene og genotypen for hver påvist variant for en prøve.
 - ▶ Den genomiske koordinaten, cDNA-navnet fra Human Genome Variation Society (HGVS) og proteinnavnet (hvis det er tilgjengelig) rapporteres for hver variant.
 - ▶ Varianttypen identifiseres som enkel nukleotidvariant (SNV), deleasjon/insersjon-variant (DIV), PolyTG/PolyT-variant (PolyTGPolyT) eller stor deleasjon (DEL).
 - ▶ Genotypebetegnelsen (enten heterozygot eller homozygot) kan avledes fra «referanse»-baseinformasjonen, som gir referansesekvensen ved denne genomiske koordinaten og «resultat»-beskrivelsen, som gir de to allelene ved den genomiske posisjonen i prøven. Hvis for eksempel referansen er «G» og resultatet er «A/G», angir dette en G>A-endring ved denne genomiske koordinaten og at denne genotypen er heterozygot for variantallelen. Hvis referansen er «G» og resultatet er «T/T», angir dette en G>T-endring ved denne genomiske koordinaten og at denne genotypen er homozygot for variantallelen.
 - ▶ Sekvenseringsdybden ved variantposisjonen gis i feltet «Depth» (Dybde) og allelefrekvensen i delen «Frequency» (Frekvens).
- ▶ Analyserapporten gir informasjon om prøvebetegnelsesfrekvens for hver prøve. Betegnelsesfrekvens beregnes som antall variantposisjoner/-regioner som oppfyller en forhåndsdefinert konfidensverditerskel, dividert med det totale antallet posisjoner/regioner i spørningen.
 - ▶ Den genomiske koordinaten for en hvilken som helst posisjon eller region der konfidensverdien er under terskelen, er oppført separat i delen «Coordinates not called» (Koordinatene ikke betegnet). Brukere skal evaluere posisjonene som ikke er betegnet, mot relevant variantinformasjon for å identifisere varianter som kan ha vært oversett og deres tilsvarende populasjonsfrekvenser for å bestemme om prøven må gjentas.
- ▶ Et prøveresultat anses kun som gyldig hvis betegnelsesfrekvensen er $\geq 99\%$. Hvis betegnelsesfrekvensen er under 99 %, vil ytelsen bli rapportert som «ikke bestått», og prøven må gjentas.
- ▶ Det anbefales at eventuelle varianter utenfor det som ble validert i nøyaktighetsstudien (se **Nøyaktighet på side 57**), verifiseres av brukeren ved hjelp av en validert referansemetode før rapportering av det første pasientresultatet med disse variantene.



MERK

Haplotyfefasing skal vurderes når det påvises to eller flere varianter.

- ▶ Alle varianttolkninger skal utføres av en godkjent molekylær genetiker eller tilsvarende i henhold til lokale prosedyrer og retningslinjer¹⁵. Potensielle tolkningsreferanser inkluderer, men er ikke begrenset til: CFTR2-database^{11,12}, Sosnay-publikasjon¹³, ACMG-retningslinjer fra 2004¹ og ACOG-komiteens meninger fra 2011². Du finner informasjon om hvordan resultater beregnes og presenteres, samt en beskrivelse av innholdet i tekstfilrapport, i retningslinjene for analyseprogramvaren som er installert på MiSeqDx. Du finner informasjon om Local Run Manager i *Referanseveiledning for Local Run Manager Software for MiSeqDx (dokumentnr. 100000011880)* og *Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 Analysis Module (dokumentnr. 1000000100946)*.
- ▶ Genetikeren skal bruke Local Run Manager Software for å angi en tolkningsverdi for hver variant rapportert på en prøve ved å bruke en rullegardinmeny. Tolkingsverdivalgene er: CF-fremkallende, mutasjon med varierende kliniske konsekvenser, mutasjon av ukjent signifikans eller ikke-CF-fremkallende. Verdien som angis, vil bli lagt til resultatfilen og vises i tolkningskolonnen i rapporten for klinisk sekvenseringsanalyse.

Kvalitetskontrollprosedyrer

God laboratoriepraksis tilsier at kontrollmaterieell skal evalueres for å påvise forskjeller i blodbehandling og tekniske prosedyrer i brukerens laboratorium som kan gi betydelig variasjon i resultatene.

- **Negativ kontroll** (NTC eller kontroll uten mal) – Det må brukes en negativ kontroll i alle kjøringene for å påvise mulige forekomster av kontaminasjon. Betegnelsesfrekvensen for den negative kontrollen skal være mindre enn 10 %. Hvis en negativ kontroll genererer en betegnelsesfrekvens $> 10\%$ og malslangevask ble utført for forrige

kjøring, kan det ha oppstått kontaminasjon under analysebehandling. Analysen anses som ikke bestått, og hele analysen må gjentas fra bibliotekklargjøring. Den negative kontrollprøven rapporteres som bestått hvis den genererer en betegnelsesfrekvens $\leq 10\%$ og ikke bestått hvis betegnelsesfrekvensen er $> 10\%$.



MERK

Det er avgjørende å kjøre malslangevasken etter hver sekvenseringskjøring for å forhindre forhøyet betegnelsesfrekvens for negativ kontroll. Hvis betegnelsesfrekvens for negativ kontroll er $> 10\%$ og malslangevasken ikke ble utført i forrige kjøring, anbefales det at operatøren fullfører en etter kjøring-vask med malslangevask og gjentar sekvenseringskjøring.

- **Positive kontroller** – Det kreves en positiv DNA-kontrollprøve for hver kjøring. Den positive kontroll-DNA-prøven skal være en godt karakterisert prøve med minst én kjent CFTR-variant.¹⁶ Illumina anbefaler å bruke roterende positive kontroller som er i samsvar med ACMGs tekniske standarder og retningslinjer for CF-mutasjonstesting fra 2008¹⁷ og ACMGs kliniske laboratoriestandarder for neste generasjons sekvensering fra 2013.¹⁸ Den positive kontrollprøven må generere den forventede genotypen. Hvis den positive kontrollen genererer en annen genotype enn forventet, kan det ha oppstått en feil i prøvesporing eller feil registrering av indekseringsprimere. Hele analysen må gjentas fra bibliotekklargjøring. Den positive kontrollprøven rapporteres som bestått hvis den genererer en betegnelsesfrekvens $\geq 99\%$ og ikke bestått hvis betegnelsesfrekvensen er $< 99\%$.
- **Villtypekontroll** – Villtype-DNA-kontrollprøven anbefales for alle kjøringer. Villtypekontrollprøven skal være en godt karakterisert prøve som ikke inneholder noen CFTR-varianter. Villtypekontrollprøven må generere den forventede genotypen. Hvis villtypekontrollen genererer en annen genotype enn forventet, kan det ha oppstått en feil i prøvesporing eller feil registrering av indekseringsprimere. Hele analysen må gjentas fra bibliotekklargjøring.
- Et prøveresultat anses kun som gyldig hvis betegnelsesfrekvensen er $\geq 99\%$. Hvis betegnelsesfrekvensen er under 99% , vil ytelsen bli rapportert som «ikke bestått», og prøven må gjentas.
- Før dette produktet brukes i brukerens laboratorium for første gang, skal testens ytelse verifiseres ved å teste en rekke positive og negative prøver med kjente ytelsesegenskaper.
- Alle krav til kvalitetskontroll skal utføres i henhold til lokale, statlige og/eller føderale forskrifter eller akkrediteringskrav.

Ytelseskarakteristikker for Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

Ytelseskarakteristikkene for Cystic Fibrosis 139-Variant Assay er basert på studier som benyttet MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay. Ekvivalens mellom TruSight- og MiSeqDx-analysene finner du under [Ytelsesekvivalens med Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay på side 55](#).

Nøyaktighet

Nøyaktighet for Cystic Fibrosis 139-Variant Assay ble vurdert ved å evaluere 500 prøver som representerte et bredt spekter av CFTR-varianter fra fire separate kilder. Den primære kilden til nøyaktighetsdata var en klinisk nøyaktighetsstudie utført ved hjelp av et panel på 366 prøver. Majoriteten ($n = 355$) av prøvene besto av arkiverte, anonymiserte kliniske gDNA-prøver isolert fra humant blod. De gjenværende 11 prøvene ble oppnådd fra kommersielt tilgjengelige cellelinjeprøver.

Data fra denne studien ble supplert med nøyaktighetsdata fra 68 cellelinjeprøver evaluert i reproduserbarhetsstudien, 14 kliniske prøver fra analysestudien til evaluering av ekstraksjonsmetoden og 52 syntetiske plasmidprøver. De syntetiske plasmidene ble utformet for å inkludere den genomiske konteksten til de sjeldne variantene, og inneholdt alt fra én til ni varianter i samme konstruksjon. De ble linearisert, fortynnet til genomisk DNA-ekvivalente kopinumre og blandet med humane genomiske DNA-prøver av villtypegenotype ved ekvivalente kopinumre for å etterligne en heterozygot prøve.

Genotypingresultatene for 137 SNV/små InDel-steder, inkludert PolyTG/PolyT-regionen, ble sammenlignet med toveis Sanger-sekvensanalyse. To validerte, PCR-baserte analyser ble brukt som referansemethode for de to store delesjonene i panelet. Hver dupleks PCR-analyse benyttet seg av to primersett for å skille mellom villtype,

heterozygote og homozygote genotyper. Ett av primersettene var utformet for å flankere delejonsbruddpunktene, mens det andre forsterket et område som var internt i slettingen. De to produktene ble påvist ved størrelsesseparasjon på en agarosegel.

PCR-analysene ble validert ved hjelp av et panel på 28 prøver (22 prøver for hver deleksjon) bestående av cellelinje- og blodavlede genomiske DNA-prøver og syntetiske plasmider, som omfattet WT-, HET- og HOM-genotypene for hver store deleksjon. PCR-analysene ble bekreftet å ha 100 % spesifisitet og reproduserbarhet for alle testede prøver ved evaluering av PCR-produkter på en agarosegel. Nøyaktigheten av PCR-analysene ble bekreftet ved hjelp av Sanger-sekvensering og funnet å være 100 % for alle prøver.

Nøyaktighet ble bestemt for hver genotype gjennom tre statistiske mål. Positivt samsvar (PA) ble beregnet for hver variantgenotype ved å dividere antall prøver med samsvarende varianter med det totale antallet prøver med denne varianten som referansemethodene identifiserte. Negativt samsvar (NA) ble beregnet på tvers av alle villtype (WT)-posisjoner ved å dele antall samsvarende WT-posisjoner med det totale antall WT-posisjoner som referansemethodene definerte. Samlet samsvar (OA) ble beregnet på tvers av alle rapporterte posisjoner ved å dividere antall samsvarende WT- og variantposisjoner med det totale antallet rapporterte posisjoner som referansemethodene bestemte.

Cystic Fibrosis 139-Variant Assay hadde et PA for genotypenivå på 100 %. NA for alle WT-posisjoner var > 99,99 %, og OA for alle rapporterte posisjoner var > 99,99 %. Alle testresultater er basert på innledende testing.

Tabell 14 Samlet nøyaktighet for Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

Variant (vanlig navn)	Varianttype	cDNA-navn	Betegnelser totalt per variant	Positive betegnelser (varianter)			Negative betegnelser (villtype)	Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet samsvar (%)
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver						
CFTR dele2, 3	DEL	c.54-5940_ 273+10250 del21kb	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
E60X	SNV	c.178G>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
P67L	SNV	c.200C>T	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R75X	SNV	c.223C>T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G85E	SNV	c.254G>A	500	6	2	0	492	0	0	100	100	100
394delTT	DIV	c.262_263 delTT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
406-1G>A	SNV	c.274-1G>A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
E92X	SNV	c.274G>T	500	0	1	1	498	0	0	100	100	100
D110H	SNV	c.328G>C	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R117C	SNV	c.349C>T	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
R117H	SNV	c.350G>A	500	17	2	0	481	0	0	100	100	100
Y122X	SNV	c.366T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
621+1G>T	SNV	c.489+1G>T	500	7	5	0	488	0	0	100	100	100
663delT	DIV	c.531delT	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
G178R	SNV	c.532G>A	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
711+1G>T	SNV	c.579+1G>T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
P205S*	SNV	c.613C>T	500	1	0	1	498	0	0	100*	100	100
L206W	SNV	c.617T>G	500	8	1	0	491	0	0	100	100	100
1078delT	DIV	c.948delT	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
G330X	SNV	c.988G>T	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R334W	SNV	c.1000C>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
I336K	SNV	c.1007T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
1154insTC	DIV	c.1022_1023 insTC	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100

Variant (vanlig navn)	Varianttype	cDNA-navn	Betegnelser totalt per variant	Positive betegnelser (varianter)			Negative betegnelser (villtype)	Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet samsvar (%)
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver						
R347H	SNV	c.1040G>A	500	6	1	1	492	0	0	100	100	100
R347P	SNV	c.1040G>C	500	3	2	0	495	0	0	100	100	100
R352Q	SNV	c.1055G>A	500	5	0	0	495	0	0	100	100	100
A455E	SNV	c.1364C>A	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
S466X (C>G)	SNV	c.1397C>G	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
1548delG	DIV	c.1418delG	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
Q493X	SNV	c.1477C>T	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
I507del	DIV	c.1519_1521 delATC	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
F508del	DIV	c.1521_1523 delCTT	500	84	29	0	387	0	0	100	100	100
1677delTA	DIV	c.1545_1546 delTA	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
V520F	SNV	c.1558G>T	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
1717-1G>A	SNV	c.1585-1G>A	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
G542X	SNV	c.1624G>T	500	12	3	0	485	0	0	100	100	100
S549N	SNV	c.1646G>A	500	2	2	1	495	0	0	100	100	100
S549R (c.1647T>G)	SNV	c.1647T>G	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G551D	SNV	c.1652G>A	500	8	3	0	489	0	0	100	100	100
R553X	SNV	c.1657C>T	500	8	2	0	490	0	0	100	100	100
A559T	SNV	c.1675G>A	500	4	0	1	495	0	0	100	100	100
R560T	SNV	c.1679G>C	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
1812-1 G>A	SNV	c.1680-1G>A	500	0	2	0	498	0	0	100	100	100
1898+1G>A	SNV	c.1766+1G>A	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100
2143delT	DIV	c.2012delT	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100
2183AA>G	DIV	c.2051_ 2052del AAinsG	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100

Variant (vanlig navn)	Varianttype	cDNA-navn	Betegnelser totalt per variant	Positive betegnelser (varianter)			Negative betegnelser (villtype)	Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet samsvar (%)
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver						
2184insA	DIV	c.2052_2 053insA	500	3	0	1	496	0	0	100	100	100
2184delA	DIV	c.2052delA	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R709X	SNV	c.2125C>T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
K710X	SNV	c.2128A>T	500	3	0	0	497	0	0	100	100	100
2307insA	DIV	c.2175_21 76insA	500	3	0	2	495	0	0	100	100	100
R764X	SNV	c.2290C>T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
W846X	SNV	c.2537G>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
2789+5G>A	SNV	c.2657+5G>A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
Q890X	SNV	c.2668C>T	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3120G>A	SNV	c.2988G>A	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3120+1G>A	SNV	c.2988+1G>A	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100
3272-26A>G	SNV	c.3140-2 6A>G	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R1066C	SNV	c.3196C>T	500	6	0	0	494	0	0	100	100	100
R1066H	SNV	c.3197G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
W1089X	SNV	c.3266G>A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
Y1092X (C>A)	SNV	c.3276C>A	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
M1101K	SNV	c.3302T>A	500	2	2	0	496	0	0	100	100	100
R1158X	SNV	c.3472C>T	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100
R1162X	SNV	c.3484C>T	500	5	1	0	494	0	0	100	100	100
3659delC	DIV	c.3528delC	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
S1196X	SNV	c.3587C>G	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3791delC	DIV	c.3659delC	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
3849+10kbC>T	SNV	c.3717+12 191C>T	500	11	2	0	487	0	0	100	100	100

Variant (vanlig navn)	Varianttype	cDNA-navn	Betegnelser totalt per variant	Positive betegnelser (varianter)			Negative betegnelser (villtype)	Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet samsvar (%)
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver						
3876delA	DIV	c.3744delA	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
S1251N	SNV	c.3752G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
3905insT	DIV	c.3773_3 774insT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
W1282X	SNV	c.3846G>A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
N1303K	SNV	c.3909C>G	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
CFTR dele22,23 [§]	DEL	c.3964-78_ 4242+577del	500	1	0	1	498	1 [§]	0	100	99,80	99,80
M1V	SNV	c.1A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q39X	SNV	c.115C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
405+1 G>A	SNV	c.273+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E92K	SNV	c.274G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q98X	SNV	c.292C>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
457TAT>G	DIV	c.325_327 delTATinsG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
574delA	DIV	c.442delA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
711+3A>G	SNV	c.579+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
711+5 G>A	SNV	c.579+5G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
712-1 G>T	SNV	c.580-1G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
H199Y	SNV	c.595C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q220X	SNV	c.658C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
852del22	DIV	c.720741 delAGGG AGAAT GATGAT GAAGTAC	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
T338I	SNV	c.1013C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S341P	SNV	c.1021T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variant (vanlig navn)	Varianttype	cDNA-navn	Betegnelser totalt per variant	Positive betegnelser (varianter)			Negative betegnelser (villtype)	Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet samsvar (%)
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver						
1213delT	DIV	c.1081delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1248+1G>A	SNV	c.1116+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1259insA	DIV	c.1127_1 128insA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
W401X (c.1202G>A)	SNV	c.1202G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W401X (c.1203G>A)	SNV	c.1203G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1341+1G>A	SNV	c.1209+1G>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
1461ins4	DIV	c.1329_ 1330ins AGAT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1525-1G>A	SNV	c.1393-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S466X (C>A)	SNV	c.1397C>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L467P	SNV	c.1400T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S489X	SNV	1466C>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
S492F	SNV	c.1475C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q525X	SNV	c.1573C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1717-8G>A	SNV	c.1585-8G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S549R (c.1645A>C)	SNV	c.1645A>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q552X	SNV	c.1654C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R560K	SNV	c.1679G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1811+1,6kb A>G	SNV	c.1679+1,6 kbA>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E585X	SNV	c.1753G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1898+3A>G	SNV	c.1766+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L732X	SNV	c.2195T>G	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100

Variant (vanlig navn)	Varianttype	cDNA-navn	Betegnelser totalt per variant	Positive betegnelser (varianter)			Negative betegnelser (villtype)	Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet samsvar (%)
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver						
2347delG	DIV	c.2215delG	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2585delT	DIV	c.2453delT	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E822X	SNV	c.2464G>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2622+1G>A ^{fl}	SNV	c.2490+1G>T ^{fl}	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E831X	SNV	c.2491G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R851X	SNV	c.2551C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
2711delT	DIV	c.2583delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L927P	SNV	c.2780T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S945L	SNV	c.2834C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3007delG	DIV	c.2875delG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G970R	SNV	c.2908G>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3121-1G>A	SNV	c.2989-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1065P	SNV	c.3194T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1077P [^]	SNV	c.3230T>C	500	0	0	1	499	0 [^]	0	100	100	100
Y1092X (C>G)	SNV	c.3276C>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E1104X	SNV	c.3310G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W1204X (c.3611G>A)	SNV	c.3611G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W1204X (c.3612G>A)	SNV	c.3612G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G1244E	SNV	c.3731G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4005+1G>A	SNV	c.3873+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4016insT	DIV	c.3884_3 885insT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q1313X	SNV	c.3937C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4209TG TT>AA	DIV	c.4077_4080delT GTTinsAA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variant (vanlig navn)	Varianttype	cDNA-navn	Betegnelser totalt per variant	Positive betegnelser (varianter)			Negative betegnelser (villtype)	Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet samsvar (%)
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver						
4382delA	DIV	c.4251delA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
PolyTG/ PolyT [€]	PolyTGPolyT	c.1210-12T[5_9]	19	17	2	0	0	0	0	100	I/A	100
I506V [¥]	SNV	c.1516A>G	1	0	0	0	1	0	0	I/A	100	100
I507V [¥]	SNV	c.1519A>G	1	0	0	0	1	0	0	I/A	100	100
F508C [¥]	SNV	c.1523T>G	1	0	0	0	1	0	0	I/A	100	100
Totalt			67522		557		66965	1	0	100	> 99,99	> 99,99

DIV er et akronym for Deletion Insertion Variant (delesjon/insersjon-variant).

* Sanger-rapporten indikerte P205S-varianten som heterozygot for den kliniske prøven. En gjennomgang av Sanger-sporingsdata indikerte imidlertid at varianten faktisk var homozygot og rapportert feil. MiSeqDx rapporterte varianten som homozygot.

§ En syntetisk prøve heterozygot for ekson 8 ble rapportert som heterozygot for varianten CFTR dele22, 23. Videre undersøkelser avdekket at dette resultatet sannsynligvis skyldtes kontaminasjon på lavt nivå.

^ Den opprinnelige syntetiske heterozygote prøven ble bestemt å være klargjort på feil måte. Da den deretter ble testet etter at den ble klargjort ved hjelp av det samme plasmidet, ble det påvist.

€ Når R117H er positiv, rapporteres PolyTG/PolyT-varianten i tillegg.

¥ I tilfellet med én homozygot F508del-variant ble det i tillegg rapportert tre ekstra villtypebaser (dvs. varianter I506V, I507V, F508C) som ikke ble identifisert i prøven.

¶ Den opprinnelige valideringsstudien for analysen omfattet 2 syntetiske prøver som inneholdt nukleotidendringen c.2490+1G>T for variant 2622+1 G>A (data er inkludert i denne tabellen). En andre valideringsstudie ble senere utført med en syntetisk prøve som inneholdt nukleotidendringen c.2490+1G>A for å støtte den faktiske nukleotidendringen (c.2490+1G>A) tilknyttet varianten.

Tabell 15 Nøyaktighet for Cystic Fibrosis 139-Variant Assay for I506V, I507V og F508C.

Variant (vanlig navn)	Betegnelser totalt per variant	Positive betegnelser (varianter)			Negative betegnelser (villtype)	Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet samsvar (%)
		Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver						
I506V	500	7	0	0	493	0	0	100	100	100
I507V	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
F508C	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100

Tabell 16 Nøyaktighet for Cystic Fibrosis 139-Variant Assay for PolyTG/PolyT-varianter

PolyTG/PolyT-genotype	Antall kliniske prøver	Antall cellelinjeprøver	Antall syntetiske prøver	Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser*	% nøyaktighet
(TG)9(T)7/(TG)11(T)7	2	0	0	0	1	50
(TG)9(T)9/(TG)10(T)7	1	0	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)9	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	25	8	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	10	1	0	0	1	90,9
(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	7	6	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)7	13	0	0	0	1	92,3
(TG)11(T)5/(TG)11(T)7	6	0	0	1	0	83,3
(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	52	8	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9^	2	1	0	3^	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
Totalt**		448		4	3	98,44

* Prøver ble ikke testet på nytt.

^ Ett av de diskordante resultatene var fra reproducerbarhetsstudien. PolyTG/PolyT-resultatet for prøven var konkordant for alle 18 replikater, men diskordant med toveis Sanger-sekvensering.

** Det totale prøveantallet for PolyTG/PolyT-varianten er 448, fordi alle syntetiske prøver (n = 52) ble bygget ved å blande lineariserte plasmider med én av to cellelinjeprøver, som var del av reproducerbarhetsstudien. Ettersom rapportering av PolyTG/PolyT-varianten for disse ytterligere syntetiske prøvene ville føre til at varianten ble overrapportert, ble de syntetiske prøvene utelatt fra denne analysen.

Reproduserbarhet

Reproduserbarheten for Cystic Fibrosis 139-Variant Assay ble bestemt gjennom en blindet studie ved hjelp av tre studiesteder og to operatører på hvert sted. To godt karakteriserte paneler med 46 prøver hver ble testet av hver operatør på hvert sted for totalt 810 betegnelser per sted. Panelene inneholdt en blanding av genomisk DNA fra lymfoblastoidcellelinjer med kjente varianter i *CFTR*-genet, samt leukocytutttømt blod tilsatt lymfoblastoidcellelinjer med kjente varianter i *CFTR*-genet. Blodprøvene ble gitt for å tillate inkorporering av ekstraksjonstrinnene som ble brukt for å klargjøre gDNA som fungerer som den primære innmatingen for analysens arbeidsprosess.

Prøvens bestått-frekvens, definert som antall prøver som består kvalitetskontrollmetrikk på første forsøk, var 99,9 %.

Det positive samsvaret på genotypenivå for alle varianter var 99,77 %. Det negative samsvaret for alle WT-posisjoner var 99,88 %, og det samlede samsvaret for alle rapporterte posisjoner var 99,88 %. Alle testresultater er basert på innledende testing. Ingen gjentatt testing ble utført for reproduserbarhetsstudien.

Tabell 17 Reproduserbarhet for Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

Panel	Prøvenr.	Prøvegenotype	Varianter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarende betegnelser (varianter)			Negative samsvarende betegnelser (villtype)			Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4*	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1*	100	100	100
A	5^	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135^	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**	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
A	10**	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Prøvenr.	Prøvegenotype	Varianter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarende betegnelser (varianter)			Negative samsvarende betegnelser (villtype)			Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C finnes ikke	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	I/A	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Prøvenr.	Prøvegenotype	Varianter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarende betegnelser (varianter)			Negative samsvarende betegnelser (villtype)			Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	I/A	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	I/A	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	I/A	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Prøvenr.	Prøvegenotype	Varianter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarende betegnelser (varianter)			Negative samsvarende betegnelser (villtype)			Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	I/A	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	I/A	100	100
B	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	59	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	I/A	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	I/A	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	I/A	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	I/A	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 [§]	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 [§]	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	Prøvenr.	Prøvegenotype	Varianter	Totale betegnelser per sted	Positive samsvarende betegnelser (varianter)			Negative samsvarende betegnelser (villtype)			Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Samlet samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
B	75 [^]	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 [^]	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	I/A	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 [§]	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 [§]	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	I/A	100	100
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Totalt				74 556	2209			221 182			4	273	99,77	99,88	99,88

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

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

** Evidens indikerer at prøve 9 og 10 sannsynligvis ble byttet om av operatoren for bibliotekklargjøring.

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

Tabell 18 Tilleggsinformasjon om varianter for reproducerbarhetsstudie

Variasjon (vanlig navn)	Varianttype	CFTR-genregion
PolyTG/PolyT	Forbindelse DIV*	Intron 9
2183AA>G	Forbindelse DIV*	Ekson 14
CFTR dele2, 3	DEL	Intron 1-Intron 3
1154insTC	DIV*	Ekson 8
I507del	DIV*	Ekson 11
F508del	DIV*	Ekson 11
2143delT	DIV*	Ekson 14
3659delC	DIV*	Ekson 22
3876delA	DIV*	Ekson 23
394delTT	DIV i homopolymer region*	Ekson 3
1078delT	DIV i homopolymer region*	Ekson 8
2184delA	DIV i homopolymer region*	Ekson 14
3905insT	DIV i homopolymer region*	Ekson 23
E60X	SNV	Ekson 3
R75X	SNV	Ekson 3
G85E	SNV	Ekson 3
E92X	SNV	Ekson 4
R117H	SNV	Ekson 4
Y122X	SNV	Ekson 4
621+1G>T	SNV	Intron 4
G178R	SNV	Ekson 5
711+1G>T	SNV	Intron 5
L206W	SNV	Ekson 6
G330X	SNV	Ekson 8
R334W	SNV	Ekson 8
I336K	SNV	Ekson 8
R347P	SNV	Ekson 8
R347H	SNV	Ekson 8
A455E	SNV	Ekson 10
Q493X	SNV	Ekson 11
1717-1G>A	SNV	Intron 11
G542X	SNV	Ekson 12
S549N	SNV	Ekson 12
S549R (c.1647T>G)	SNV	Ekson 12
G551D	SNV	Ekson 12
R553X	SNV	Ekson 12
R560T	SNV	Ekson 12
1812-1 G>A	SNV	Intron 12

Variasjon (vanlig navn)	Varianttype	CFTR-genregion
1898+1G>A	SNV	Intron 13
W846X	SNV	Ekson 15
2789+5G>A	SNV	Intron 16
3120+1G>A	SNV	Intron 18
3272-26A>G	SNV	Intron 19
Y1092X (C>A)	SNV	Ekson 20
M1101K	SNV	Ekson 20
R1158X	SNV	Ekson 22
R1162X	SNV	Ekson 22
3849+10kbC>T	SNV	Intron 22
W1282X	SNV	Ekson 23
N1303K	SNV	Ekson 24

* DIV er et akronym for Deletion Insertion Variant (delesjon/insersjon-variant).

DNA-ekstraksjon

Tre vanlig brukte, kommersielt tilgjengelige ekstraksjonsmetoder som representerte magnetkuleekstraksjon, alkoholutfelling og kvartfilter-kolonnesolasjon ble evaluert ved hjelp av EDTA-antikoagulert fullblod. Totalt 14 unike blodprøver ble brukt i studien som representerte villtype og tre mutante genotyper (tre prøver med F508del, én prøve med I506V og én prøve med D110H). De tre DNA-ekstraksjonsmetodene ble testet uavhengig av to forskjellige operatører som hver utførte tre kjøring per ekstraksjonsmetode. Hver ekstraksjon ble utført av hver operatør på ulike dager. DNA-konsentrasjonen og A260/A280-forholdet i de ekstraherte gDNA-prøvene ble bestemt med spektrofotometri. Den totale prøvestørrelsen for hver ekstraksjonsmetode i denne studien var 168 (14 prøver x 2 operatører/ekstraksjonsmetode x 3 kjøring/operatør x 2 replikater / ekstrahert gDNA-prøve).

Ekstraksjonsmetode	Antall prøver som ble testet	Betegnelsesfrekvens	Nøyaktighet	Prøvens første bestått-frekvens*
Alkoholutfelling	168	100 %	100 %	100 %
Kvartfilter-kolonnesolasjon	168	100 %	100 %	100 %
Magnetkuleekstraksjon	168	100 %	100 %	100 %

* Prosent prøver som hadde betegnelsesfrekvens på ≥ 99 % i første kjøring.

DNA-innmating

DNA-innmatingsområdet for Cystic Fibrosis 139-Variant Assay ble evaluert ved å utføre en seriell fortynningsstudie ved hjelp av 14 representative DNA-prøver som inneholdt 16 unike CF-varianter. Hver prøve ble testet i duplikat på ni DNA-innmatingsnivåer fra 1250–1 ng (1250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng og 1 ng). For bestemmelse av nøyaktighet ble prøvenes genotyper sammenlignet med toveis Sanger-sekvenseringsdata, og delesjonene ble sammenlignet med PCR-analyse. 1250 ng og 25 ng ble identifisert som henholdsvis øvre og nedre grense for DNA-innmating, ettersom de hadde ≥ 95 % bestått-frekvens ved første prøvekjøring uten feil betegnelser (100 % nøyaktighet og betegnelsesfrekvens).

DNA-innmatinger på 1250 ng, 250 ng og 100 ng ble videre testet med fire representative DNA-prøver og minst 20 replikater per DNA-innmatingsnivå for hver prøve ($n = 4 \times 20 = 80$ prøver), mens den nedre grensen på 25 ng ble testet med 14 prøver, 20 replikater for hver prøve ($n = 14 \times 20 = 280$ prøver). Nøyaktigheten og prøvens første bestått-frekvens var 100 % på alle DNA-innmatingsnivåer.

Resultatene indikerer at Cystic Fibrosis 139-Variant Assay kan brukes i DNA-innmatingsområdet fra 1250–25 ng for å gi nøyaktige resultater.

Forstyrrende stoffer

For å vurdere virkningen av forstyrrende stoffer på Cystic Fibrosis 139-Variant Assay ble resultatene av analysen evaluert i nærvær og fravær av potensielle forstyrrende stoffer. Åtte fullblodsprøver ble testet i studien, inkludert tre CF-positive prøver med unike genotyper. Fire endogene forstyrrende stoffer (bilirubin, kolesterol, hemoglobin og triglyserid) ble testet ved å tilsette dem i blodprøver før DNA-ekstraksjon.

Konsentrasjonsgrensene for hvert stoff vises i tabellen som følger. For å vurdere forstyrrelse fra blodprøvetaking (kort prøvetaking) ble EDTA tilsatt i blodprøver, og for å vurdere forstyrrelse som resulterte fra prøveklargjøring, ble den endelige vaskebufferen fra en kvartfilter-kolonneisolasjonsmetode tilsatt i rensset genomisk DNA.

Cystic Fibrosis 139-Variant Assay oppnådde 100 % betegnelsesfrekvens for alle prøvene som ble testet, og 100 % reproduserbarhet i genotypebetegnelser mellom prøver i nærvær og fravær av forstyrrende stoffer.

For å vurdere virkningen av multipleksing indeksprimerforstyrrelse ble det utført en krysskontaminasjonsstudie med to prøver, hver med unike homozygote genotyper i fire forskjellige genomiske posisjoner, og to respektive indeksprimere. Ingen endring ble observert i variantbetegnelser med kontaminasjonsnivåer < 40 %.

Prøvegenotypen ble heterozygot når kontaminasjonsnivåer var ≥ 40 %.

Ingen forstyrrelse ble observert fra noen av de endogene eller eksogene forstyrrende stoffene.

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

Prøveindeksering

Prøveindeksprimere brukes i analysen for å tilordne en unik strekkode til hver prøves DNA, slik at det er mulig å slå sammen flere prøver til en enkelt sekvenseringskjøring. Totalt 96 prøveindekser ble testet ved å bruke åtte unike DNA-prøver for å verifisere analysens evne til å gjennomføre en genotypingsbetegnelse konsekvent for en gitt prøve på tvers av forskjellige indekseringsprimerkombinasjoner. Hver prøve ble testet med 12 forskjellige indekseringsprimerkombinasjoner. Prøveresultater ble sammenlignet med toveis Sanger-sekvenseringsdata for alle posisjoner/varianter unntatt de to store delesjonene, som ble bekreftet ved hjelp av en dupleks PCR-analyse. Reproduserbarhet og nøyaktighet var 100 % for alle prøve/indeksprimer-kombinasjoner.

Ytelsesekvivalens med Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay (TruSight CF139) bruker samme arbeidsprosess for bibliotekklargjøring som Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis Assay (MiSeqDx CF139). TruSight CF139 bruker MiSeqDx Reagent Kit v3, mens MiSeqDx CF139 bruker sekvenseringsreagenser som følger med analysen. For å vise ekvivalens mellom TruSight CF139 og MiSeqDx CF139 ble resultater fra ni TruSight CF139-kjøringer sammenlignet med en enkelt MiSeqDx CF139-kjøring som gullstandarden. TruSight CF139-kjøringer ble utført ved 96 prøvegjennomløp (maksimalt prøvegjennomløp for TruSight CF139) og MiSeqDx CF139 ved 48 prøvegjennomløp (maksimalt prøvegjennomløp for MiSeqDx CF139). Kilder til variabilitet for TruSight CF139-kjøringer omfattet tre bibliotekklargjøringshendelser (hver med en unik lot av TruSight Cystic Fibrosis), tre operatører, tre MiSeqDx-instrumenter og tre loter av MiSeqDx Reagent Kit v3.

Variantbetegnelser fra TruSight CF139-kjøringer ble sammenlignet med betegnelser utført ved MiSeqDx CF139-kjøringen. 47 unike prøver var inkludert i hver TruSight CF139-kjøring, med 2–3 replikater per prøve (95 DNA-prøver og 1 NTC per kjøring). For MiSeqDx CF139-kjøringen ble de samme 47 prøvene sekvensert i singlikat (47 DNA-prøver + 1 NTC per kjøring). Prøvepanelet besto av Coriell DNA-prøver ekstrahert fra udødeliggjorte cellelinjer, og omfattet prøver som representerte hvert allel av ACMG 23-mutasjonene, delesjon/insersjon-varianter (inkludert insersjon/delesjoner i homopolymeriske regioner og insersjon-med-delesjon i den samme regionen), homozygote varianter, heterozygote forbindelsesvarianter, én av de målrettede store delesjonene, en vanlig PolyTG/PolyT-variant, flere enkle nukleotidvarianter og en prøve uten påviste varianter. Sammendrag av resultater etter genotype er oppgitt i **Tabell 19**. Samsvar mellom analyser etter varianttype presenteres i **Tabell 20**. Samlet (totalt) samsvar mellom analyser var > 99,99 %.

Tabell 19 Variantbetegnende ytelse for TruSight CF 139-Variant Assay sammenlignet med MiSeqDx CF 139-Variant Assay

		MiSeqDx CF 139-Variant Assay				Totalt
		HOM-variant	HET-variant	Villtype	Ingen betegnelse	
TruSight CF 139-Variant Assay	HOM-variant	87	–	–	–	87
	HET-variant	–	1098	–	–	1098
	Villtype	–	–	113 889	–	113 889
	Ingen betegnelse	–	–	–	–	–
	Totalt	87	1098	113 889	–	115 074

Tabell 20 Ytelse etter varianttype for TruSight CF 139-Variant Assay sammenlignet med MiSeqDx CF 139-Variant Assay

Varianttype	Riktige betegnelser	Feil betegnelser	Ingen betegnelser	Samsvar med MiSeqDx CF 139 Assay
SNV	672	0	0	100,00 % (672/672)
DEL	18	0	0	100,00 % (18/18)
DIV	495	0	0	100,00 % (495/495)
PolyTG/PolyT	17	1	0	94,44 % (17/18)
Ingen (villtype)	113 889	0	0	100,00 % (113 889/113 889)
Totalt	115 091	1	0	> 99 99 % (115 091/115 092)

En enkelt diskordant betegnelse ble observert mellom TruSight CF139 og MiSeqDx CF139. Den spesifikke feilbetegnelsen var en PolyTG/PolyT-variant. Sammendrag av PolyTG/PolyT-samsvar er oppgitt i **Tabell 21**. Ettersom PolyTG/PolyT-genotypen kun rapporteres hvis også R117H-varianten påvises, omfatter datasettet kun PolyTG/PolyT-betegnelser fra en enkelt DNA-kilde.

Tabell 21 PolyTG/PolyT-variantbetegnende ytelse for TruSight CF 139-Variant Assay sammenlignet med MiSeqDx CF 139-Variant Assay

		MiSeqDx CF 139-Variant Assay			Totalt
		(TG)12(T)5 / (TG)10(T)9	(TG)12(T)5 / (TG)12(T)5	Ingen betegnelse	
TruSight CF 139-Variant Assay	(TG)12(T)5 / (TG)10(T)9	17	–	–	17
	(TG)12(T)5 / (TG)12(T)5	1	–	–	1
	Ingen betegnelse	–	–	–	–
	Totalt	18	–	–	18

Ytelseskarakteristikker for Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

Ytelseskarakteristikkene for Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay er basert på studier som benyttet MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay. Ekvivalens mellom TruSight- og MiSeqDx-analysene finner du under *Ytelsesekvivalens med Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay* på side 86.

Nøyaktighet

Nøyaktighet for Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay ble vurdert ved å evaluere 500 prøver som representerte et bredt spekter av CFTR-varianter fra fire separate kilder. Den primære kilden til nøyaktighetsdata var en klinisk nøyaktighetsstudie utført ved hjelp av et panel på 366 prøver. Majoriteten (n = 355) av prøvene besto av arkiverte, anonymiserte kliniske gDNA-prøver isolert fra humant blod. De gjenværende 11 prøvene ble oppnådd fra kommersielt tilgjengelige cellelinjeprøver.

Data fra denne studien ble supplert med nøyaktighetsdata fra 68 cellelinjeprøver evaluert i reproduserbarhetsstudien, 14 kliniske prøver fra analysestudien til evaluering av ekstraksjonsmetoden og 52 syntetiske plasmidprøver. De syntetiske plasmidene ble utformet for å inkludere den genomiske konteksten til de sjeldne variantene, og inneholdt alt fra én til ti varianter i samme konstruksjon. De ble linearisert, fortynnet til genomisk DNA-ekvivalente kopinumre og blandet med humane genomiske DNA-prøver av villtypegenotype ved ekvivalente kopinumre for å etterligne en heterozygot prøve.

For Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay ble totalt 5206 posisjoner sammenlignet med referansemethodene for toveis Sanger-sekvensering og PCR-testing. Genotypingresultatene for SNV og små InDel-steder, inkludert PolyTG/PolyT-regionen, ble sammenlignet med toveis Sanger-sekvensanalyse.

To validerte, PCR-baserte analyser ble brukt som referansemetode for de to store delesjonene i panelet. Hver dupleks PCR-analyse benyttet seg av to primersett for å skille mellom villtype, heterozygote og homozygote genotyper. Ett av primersettene var utformet for å flankere delesjonsbruddpunktene, mens det andre forsterket et område som var internt i slettingen. De to produktene ble påvist ved størrelsesseparasjon på en agarosegel. PCR-analysene ble validert ved hjelp av et panel på totalt 28 prøver (22 prøver for hver delesjon) bestående av cellelinje- og blodavlede genomiske DNA-prøver og syntetiske plasmider, som omfattet WT-, HET- og HOM-genotypene for hver store delesjon. PCR-analysene ble bekreftet å ha 100 % spesifisitet og reproduserbarhet for alle testede prøver ved evaluering av PCR-produkter på en agarosegel. Nøyaktigheten av PCR-analysene ble bekreftet ved hjelp av Sanger-sekvensering og funnet å være 100 % for alle prøver.

Nøyaktighet ble bestemt for hver genotype gjennom tre statistiske mål. Positivt samsvar (PA) ble beregnet for hver variantgenotype ved å dividere antall prøver med samsvarende varianter med det totale antallet prøver med denne varianten som referansemethodene identifiserte. Negativt samsvar (NA) ble beregnet på tvers av alle villtype (WT)-posisjoner ved å dele antall samsvarende WT-posisjoner med det totale antall WT-posisjoner som referansemethodene definerte. Samlet samsvar (OA) ble beregnet på tvers av alle rapporterte posisjoner ved å dividere antall samsvarende WT- og variantposisjoner med det totale antallet rapporterte posisjoner som referansemethodene bestemte.

Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay hadde et PA for genotypenivå på 99,66 %, inkludert PolyTG/PolyT-varianter (100 % uten PolyTG/PolyT-varianter). NA for alle WT-posisjoner var > 99,99 %, og OA for alle rapporterte posisjoner var > 99,99 %.

[Denne siden er tom med hensikt]

Tabell 22 Samlet nøyaktighet for Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

Genotype (vanlig navn / cDNA-navn / koordinat)	cDNA-navn	Varianttype	CFTR- genregion (hg19)	Positive betegnelser (varianter)			Ingen betegnelser*	Feilbetegnelser	Positivt samsvar
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver			
117120141	c.-8G>C^	SNV	Exon1	25	3	0	0	0	100
117120145	c.-4G>C^	SNV	Exon1	3	2	0	0	0	100
M1V	c.1A>G	SNV	Exon1	0	0	1	0	0	100
CFTR dele2, 3	c.54-5940_ 273+10250 del21kb	Del	Intron1	4	1	0	0	0	100
R31C	c.91C>T	SNV	Exon2	3	1	0	0	0	100
Q39X	c.115C>T	SNV	Exon2	0	0	1	0	0	100
E60X	c.178G>T	SNV	Exon3	6	1	0	0	0	100
P67L	c.200C>T	SNV	Exon3	1	0	1	0	0	100
R74W	c.220C>T	SNV	Exon3	0	2	0	0	0	100
R74Q	c.221G>A	SNV	Exon3	2	0	0	0	0	100
R75X	c.223C>T	SNV	Exon3	3	1	0	0	0	100
R75Q	c.224G>A	SNV	Exon3	20	1	0	0	0	100
G85E	c.254G>A	SNV	Exon3	6	2	0	0	0	100
394delTT	c.262_263 delTT	DIV	Exon3	3	1	0	0	0	100
405+1G>A	c.273+1G>A	SNV	Intron3	0	0	1	0	0	100
406-1G>A	c.274-1G>A	SNV	Exon4	4	0	0	0	0	100
E92K	c.274G>A	SNV	Exon4	0	0	1	0	0	100
E92X	c.274G>T	SNV	Exon4	0	1	1	0	0	100
Q98X	c.292C>T	SNV	Exon4	0	0	2	0	0	100
444delA	c.312delA	DIV	Exon4	0	2	0	0	0	100
457TAT>G	c.325_327 delTAT insG	DIV	Exon4	0	0	1	0	0	100

Genotype (vanlig navn / cDNA-navn / koordinat)	cDNA-navn	Varianttype	CFTR- genregion (hg19)	Positive betegnelser (varianter)			Ingen betegnelser*	Feilbetegnelser	Positivt samsvar
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver			
D110H	c.328G>C	SNV	Exon4	1	0	1	0	0	100
R117C	c.349C>T	SNV	Exon4	4	0	0	0	0	100
R117H	c.350G>A	SNV	Exon4	17	2	0	0	0	100
Y122X	c.366T>A	SNV	Exon4	0	1	0	0	0	100
F143LfsX10	c.425delT	DIV	Exon4	0	1	0	0	0	100
574delA	c.442delA	DIV	Exon4	0	0	2	0	0	100
Q151K	c.451C>A	SNV	Exon4	1	0	0	0	0	100
621+1G>T	c.489+1G>T	SNV	Intron4	7	5	0	0	0	100
621+3A>G	c.489+3A>G	SNV	Intron4	1	0	0	0	0	100
663delT	c.531delT	DIV	Exon5	1	0	1	0	0	100
G178R	c.532G>A	SNV	Exon5	1	1	0	0	0	100
711+1G>T	c.579+1G>T	SNV	Intron5	3	1	0	0	0	100
711+3A>G	c.579+3A>G	SNV	Intron5	0	0	1	0	0	100
711+5 G>A	c.579+5G>A	SNV	Intron5	0	0	1	0	0	100
712-1 G>T	c.580-1G>T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
H199Y	c.595C>T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
P205S	c.613C>T	SNV	Exon6	1	0	1	0	0**	100
L206W	c.617T>G	SNV	Exon6	8	1	0	0	0	100
A209S	c.625G>T	SNV	Exon6	0	1	0	0	0	100
Q220X	c.658C>T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
L227R	c.680T>G	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100

Genotype (vanlig navn / cDNA-navn / koordinat)	cDNA-navn	Varianttype	CFTR- genregion (hg19)	Positive betegnelser (varianter)			Ingen betegnelser*	Feilbetegnelser	Positivt samsvar
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver			
852del22	c.720_741 delAGGG AGAATG ATGATG AAGTAC	DIV	Exon6	0	0	1	0	0	100
E279D	c.837A>T	SNV	Exon7	1	0	0	0	0	100
R297Q	c.890G>A	SNV	Exon8	2	0	0	0	0	100
1078delT	c.948delT	DIV	Exon8	1	1	0	0	0	100
L320V	c.958T>G	SNV	Exon8	1	0	0	0	0	100
G330X	c.988G>T	SNV	Exon8	1	1	0	0	0	100
R334W	c.1000C>T	SNV	Exon8	6	1	0	0	0	100
I336K	c.1007T>A	SNV	Exon8	0	1	0	0	0	100
T338I	c.1013C>T	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1154insTC	c.1022_10 23insTC	DIV	Exon8	0	1	0	0	0	100
S341P	c.1021T>C	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
R347H	c.1040G>A	SNV	Exon8	6	1	1	0	0	100
R347P	c.1040G>C	SNV	Exon8	3	2	0	0	0	100
R352Q	c.1055G>A	SNV	Exon8	5	0	0	0	0	100
Q359K/ T360K	c.[1075C>A ;1079C>A]	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1213delT	c.1081delT	DIV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1248+1G>A	c.1116+1G>A	SNV	Intron8	0	0	1	0	0	100
1259insA	c.1127_11 28insA	DIV	Exon9	0	0	2	0	0	100
W401X (c.1202G>A)	c.1202G>A	SNV	Exon9	0	0	1	0	0	100

Genotype (vanlig navn / cDNA-navn / koordinat)	cDNA-navn	Varianttype	CFTR- genregion (hg19)	Positive betegnelser (varianter)			Ingen betegnelser*	Feilbetegnelser	Positivt samsvar
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver			
W401X (c.1203G>A)	c.1203G>A	SNV	Exon9	0	0	1	0	0	100
1341+1G>A	c.1209+1G>A	SNV	Intron9	0	0	2	0	0	100
PolyTGPolyT	I/A	PolyTG PolyT	Intron9	369	79	52	3	4 [#]	98.60
1461ins4	c.1329_ 1330ins AGAT	DIV	Exon10	0	0	1	0	0	100
A455E	c.1364C>A	SNV	Exon10	4	2	0	0	0	100
1525-1G>A	c.1393-1G>A	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>A)	c.1397C>A	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>G)	c.1397C>G	SNV	Exon11	1	0	1	0	0	100
L467P	c.1400T>C	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
V470M	c.1408G>A	SNV	Exon11	311	71	0	0	0	100
1548delG	c.1418delG	DIV	Exon11	1	0	1	0	0	100
P477S	c.1429C>T	SNV	Exon11	0	1	0	0	0	100
S485T	c.1454G>C	SNV	Exon11	1	0	0	0	0	100
S489X	c.1466C>A	SNV	Exon11	0	0	2	0	0	100
S492F	c.1475C>T	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
Q493X	c.1477C>T	SNV	Exon11	4	2	0	0	0	100
I506V	c.1516A>G	SNV	Exon11	7	0	0	0	0	100
I507del	c.1519_1521 delATC	DIV	Exon11	4	2	0	0	0	100
F508del	c.1521_1523 delCTT	DIV	Exon11	84	29	0	0	0	100
I507V	c.1519A>G	SNV	Exon11	0	1	0	0	0	100

Genotype (vanlig navn / cDNA-navn / koordinat)	cDNA-navn	Varianttype	CFTR- genregion (hg19)	Positive betegnelser (varianter)			Ingen betegnelser*	Feilbetegnelser	Positivt samsvar
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver			
F508C	c.1523T>G	SNV	Exon11	1	1	0	0	0	100
1677delTA	c.1545_1546 delTA	DIV	Exon11	1	0	0	0	0	100
V520F	c.1558G>T	SNV	Exon11	2	0	0	0	0	100
Q525X	c.1573C>T	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
E527E	c.1581A>G	SNV	Exon11	3	2	0	0	0	100
E528E	c.1584G>A	SNV	Exon11	6	2	0	0	0	100
1717-8G>A	c.1585-8G>A	SNV	Intron11	0	0	1	0	0	100
1717-1G>A	c.1585-1G>A	SNV	Exon12	4	1	0	0	0	100
G542X	c.1624G>T	SNV	Exon12	12	3	0	0	0	100
S549R (c.1645A>C)	c.1645A>C	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
S549N	c.1646G>A	SNV	Exon12	2	2	1	0	0	100
S549R (c.1647T>G)	c.1647T>G	SNV	Exon12	3	1	0	0	0	100
G551D	c.1652G>A	SNV	Exon12	8	3	0	0	0	100
Q552X	c.1654C>T	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
R553X	c.1657C>T	SNV	Exon12	8	2	0	0	0	100
I556V	c.1666A>G	SNV	Exon12	1	0	0	0	0	100
L558S	c.1673T>C	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
A559T	c.1675G>A	SNV	Exon12	4	0	1	0	0	100
R560K	c.1679G>A	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
R560T	c.1679G>C	SNV	Exon12	6	1	0	0	0	100
1811+1,6kb A>G	c.1679+1,6 kbA>G	SNV	Intron12	0	0	1	0	0	100
1812-1 G>A	c.1680-1G>A	SNV	Exon13	0	2	0	0	0	100
A561T	c.1681G>A	SNV	Exon13	1	0	0	0	0	100

Genotype (vanlig navn / cDNA-navn / koordinat)	cDNA-navn	Varianttype	CFTR- genregion (hg19)	Positive betegnelser (varianter)			Ingen betegnelser*	Feilbetegnelser	Positivt samsvar
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver			
V562I	c.1684G>A	SNV	Exon13	1	0	0	0	0	100
Y569D	c.1705T>G	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
P574H	c.1721C>A	SNV	Exon13	0	1	0	0	0	100
G576A	c.1727G>C	SNV	Exon13	4	1	0	0	0	100
D579G	c.1736A>G	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
E585X	c.1753G>T	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
1898+1G>A	c.1766+1G>A	SNV	Intron13	2	1	0	0	0	100
1898+3A>G	c.1766+3A>G	SNV	Intron13	0	0	1	0	0	100
H609R	c.1826A>G	SNV	Exon14	0	1	0	0	0	100
D614G	c.1841A>G	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
R668C	c.2002C>T	SNV	Exon14	5	2	0	0	0	100
R668H	c.2003G>A	SNV	Exon14	1	0	0	0	0	100
2143delT	c.2012delT	DIV	Exon14	2	1	0	0	0	100
K684TfsX4	c.2046_2047 delAA	DIV	Exon14	0	0	1	0	0	100
2183AA>G	c.2051_2052 delAAinsG	DIV	Exon14	3	1	0	0	0	100
2184delA	c.2052delA	DIV	Exon14	1	1	0	0	0	100
2184insA	c.2052_2053 insA	DIV	Exon14	3	0	1	0	0	100
S686Y	c.2057C>A	SNV	Exon14	0	1	0	0	0	100
R709X	c.2125C>T	SNV	Exon14	1	0	2	0	0	100
K710X	c.2128A>T	SNV	Exon14	3	0	0	0	0	100
E725K	c.2173G>A	SNV	Exon14	2	0	0	0	0	100
2307insA	c.2175_2176 insA	DIV	Exon14	3	0	2	0	0	100
L732X	c.2195T>G	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100

Genotype (vanlig navn / cDNA-navn / koordinat)	cDNA-navn	Varianttype	CFTR- genregion (hg19)	Positive betegnelser (varianter)			Ingen betegnelser*	Feilbetegnelser	Positivt samsvar
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver			
2347delG	c.2215delG	DIV	Exon14	0	0	2	0	0	100
P750L	c.2249C>T	SNV	Exon14	1	0	0	0	0	100
V754M	c.2260G>A	SNV	Exon14	2	1	0	0	0	100
R764X	c.2290C>T	SNV	Exon14	1	0	2	0	0	100
2585delT	c.2453delT	DIV	Exon14	0	0	2	0	0	100
E822X	c.2464G>T	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
2622+1G>A	c.2490+1G>T	SNV	Intron14	0	0	2	0	0	100
E831X	c.2491G>T	SNV	Exon15	0	0	1	0	0	100
D836Y	c.2506G>T	SNV	Exon15	0	1	0	0	0	100
W846X	c.2537G>A	SNV	Exon15	0	1	0	0	0	100
R851X	c.2551C>T	SNV	Exon15	0	0	1	0	0	100
T854T	c.2562T>G	SNV	Exon15	212	44	0	0	0	100
2711delT	c.2583delT	DIV	Exon15	0	0	1	0	0	100
V868V	c.2604A>G	SNV	Exon15	2	0	0	0	0	100
c.2657+2_ 2657+3insA	c.2657+2_ 2657+3insA	DIV	Intron16	0	0	1	0	0	100
2789+5G>A	c.2657+5G>A	SNV	Intron16	9	1	0	0	0	100
Q890X	c.2668C>T	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
A923A	c.2769C>T	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
L927P	c.2780T>C	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
S945L	c.2834C>T	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
M952T	c.2855T>C	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
3007delG	c.2875delG	DIV	Exon17	0	0	1	0	0	100
T966T	c.2898G>A	SNV	Exon17	5	0	0	0	0	100
G970R	c.2908G>C	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
S977F	c.2930C>T	SNV	Exon18	0	0	1	0	0	100

Genotype (vanlig navn / cDNA-navn / koordinat)	cDNA-navn	Varianttype	CFTR- genregion (hg19)	Positive betegnelser (varianter)			Ingen betegnelser*	Feilbetegnelser	Positivt samsvar
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver			
3120G>A	c.2988G>A	SNV	Exon18	1	0	0	0	0	100
3120+1G>A	c.2988+1G>A	SNV	Intron18	7	1	0	0	0	100
3121-1G>A	c.2989-1G>A	SNV	Exon19	0	0	1	0	0	100
L997F	c.2991G>C	SNV	Exon19	2	1	0	0	0	100
I1027T	c.3080T>C	SNV	Exon19	1	2	0	0	0	100
3272-26A>G	c.3140-26A>G	SNV	Intron19	0	1	0	0	0	100
F1052V	c.3154T>G	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
L1065P	c.3194T>C	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
R1066C	c.3196C>T	SNV	Exon20	6	0	0	0	0	100
R1066H	c.3197G>A	SNV	Exon20	1	0	1	0	0	100
G1069R	c.3205G>A	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
R1070W	c.3208C>T	SNV	Exon20	0	2	0	0	0	100
R1070Q	c.3209G>A	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
L1077P	c.3230T>C	SNV	Exon20	0	0	1	0	0 ^y	100
W1089X	c.3266G>A	SNV	Exon20	4	0	0	0	0	100
Y1092X (C>A)	c.3276C>A	SNV	Exon20	3	1	0	0	0	100
Y1092X (C>G)	c.3276C>G	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
T1095T	c.3285A>T	SNV	Exon20	7	0	0	0	0	100
M1101K	c.3302T>A	SNV	Exon20	2	2	0	0	0	100
E1104X	c.3310G>T	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	SNV	Intron20	0	1	0	0	0	100
D1152H	c.3454G>C	SNV	Exon21	10	1	0	0	0	100
V1153E	c.3458T>A	SNV	Exon21	1	0	0	0	0	100
R1158X	c.3472C>T	SNV	Exon22	7	1	0	0	0	100

Genotype (vanlig navn / cDNA-navn / koordinat)	cDNA-navn	Varianttype	CFTR- genregion (hg19)	Positive betegnelser (varianter)			Ingen betegnelser*	Feilbetegnelser	Positivt samsvar
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver			
R1162X	c.3484C>T	SNV	Exon22	5	1	0	0	0	100
R1162L	c.3485G>T	SNV	Exon22	0	2	0	0	0	100
3659delC	c.3528delC	DIV	Exon22	4	1	0	0	0	100
S1196X	c.3587C>G	SNV	Exon22	1	0	0	0	0	100
W1204X (c.3611G>A)	c.3611G>A	SNV	Exon22	0	0	1	0	0	100
W1204X (c.3612G>A)	c.3612G>A	SNV	Exon22	0	0	1	0	0	100
3791delC	c.3659delC	DIV	Exon22	2	0	0	0	0	100
I1234V	c.3700A>G	SNV	Exon22	1	0	1	0	0	100
S1235R	c.3705T>G	SNV	Exon22	9	1	0	0	0	100
3849+10 kbC>T	c.3717+ 12191C>T	SNV	Intron22	11	2	0	0	0	100
G1244E	c.3731G>A	SNV	Exon23	0	0	1	0	0	100
3876delA	c.3744delA	DIV	Exon23	6	1	0	0	0	100
S1251N	c.3752G>A	SNV	Exon23	1	0	1	0	0	100
3905insT	c.3773_3774 insT	DIV	Exon23	3	1	0	0	0	100
D1270N	c.3808G>A	SNV	Exon23	0	2	0	0	0	100
W1282X	c.3846G>A	SNV	Exon23	9	1	0	0	0	100
P1290P	c.3870A>G	SNV	Exon23	10	3	0	0	0	100
4005+1G>A	c.3873+1G>A	SNV	Intron23	0	0	1	0	0	100
4016insT	c.3884_3885 insT	DIV	Exon24	0	0	1	0	0	100
T1299T	c.3897A>G	SNV	Exon24	3	0	0	0	0	100
N1303K	c.3909C>G	SNV	Exon24	9	1	0	0	0	100
Q1313X	c.3937C>T	SNV	Exon24	0	0	1	0	0	100
G1349D	c.4046G>A	SNV	Exon25	0	1	0	0	0	100

Genotype (vanlig navn / cDNA-navn / koordinat)	cDNA-navn	Varianttype	CFTR- genregion (hg19)	Positive betegnelser (varianter)			Ingen betegnelser*	Feilbetegnelser	Positivt samsvar
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver			
4209TG TT>AA	c.4077_4080 delTGTT insAA	DIV	Exon25	0	0	1	0	0	100
CFTR dele22,23	c.3964-78_ 4242+577del	Del	Intron24	1	0	1	0	0	100
4382delA	c.4251delA	DIV	Exon27	0	0	1	0	0	100
Y1424Y	c.4272C>T	SNV	Exon27	6	2	0	0	0	100
Q1463Q	c.4389G>A	SNV	Exon27	150	32	0	0	0	100
Totalt, alle varianter (PA)†						2072	3	4	99,66
Totalt, alle WT (NA)						2600928	1	2 [§]	> 99,99
Totalt, alle WT og varianter (OA)						2603000	4	6	> 99,99

DIV er et akronym for Deletion Insertion Variant (delesjon/insersjon-variant).

* Prøver ble ikke testet på nytt.

^ Programvare rapporterer ikke cDNA-navn for denne genomiske koordinaten.

** Sanger-rapporten oppga P205S-varianten som heterozygot for den kliniske prøven. En gjennomgang av Sanger-sporingsdata indikerte imidlertid at varianten faktisk var homozygot og rapportert feil. MiSeqDx rapporterte varianten som homozygot.

Ett av de diskordante resultatene var fra reproducerbarhetsstudien. PolyTG/PolyT-resultatet for prøven var konkordant for alle 18 replikater, men diskordant med toveis Sanger-sekvensering.

‡ Den opprinnelige syntetiske heterozygote prøven ble bestemt å være klagjort på feil måte. Da den deretter ble testet etter at den ble klagjort ved hjelp av det samme plasmidet, ble det påvist.

† PA unntatt PolyTG/PolyT-betegnelser var 100 %.

§ En syntetisk prøve heterozygot for ekson 8 ble rapportert som heterozygot for varianten CFTR dele22, 23. Videre undersøkelser avdekket at dette resultatet sannsynligvis skyldtes kontaminasjon på lavt nivå. For en andre prøve kunne dessuten ikke Sanger-primere påvise varianten Q1463Q fullstendig på grunn av indeler både oppstrøms og nedstrøms for variantstedet.

Tabell 23 PolyTG/PolyT-variantnøyaktighet for Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

PolyTGPolyT-genotype	Antall kliniske prøver	Antall cellelinjeprøver	Antall syntetiske prøver	Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser*	% nøyaktighet
(TG)9(T)7/(TG)11(T)7	2	0	0	0	1	50,00
(TG)9(T)9/(TG)10(T)7	1	0	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)9	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	25	8	0	0	0	100

PolyTGPolyT-genotype	Antall kliniske prøver	Antall cellelinjeprøver	Antall syntetiske prøver	Antall feilbetegnelser	Antall ingen betegnelser*	% nøyaktighet
(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	10	1	0	0	1	90,91
(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	7	6	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)7	13	0	0	0	1	92,31
(TG)11(T)5/(TG)11(T)7	6	0	0	1	0	83,33
(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	52	8	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9 [^]	2	1	0	3	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
Totalt		448		4	3	98,44

* Prøver ble ikke testet på nytt.

[^] Ett av de diskordante resultatene var fra reproduserbarhetsstudien. PolyTG/PolyT-resultatet for prøven var konkordant for alle 18 replikater, men diskordant med toveis Sanger-sekvensering.

Reproduserbarhet

Reproduserbarheten for Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay ble bestemt gjennom en blindet studie ved hjelp av 3 studiesteder og 2 operatører på hvert sted. To godt karakteriserte paneler med 46 prøver hver ble testet av hver av operatørene på hvert sted for totalt 276 prøveresultater per operatør. Panelet inneholdt en blanding av genomisk DNA fra lymfoblastoidcellelinjer med kjente mutasjoner i *CFTR*-genet, samt leukocytuttømt blod tilsatt lymfoblastoidcellelinjer med kjente mutasjoner i *CFTR*-genet. Blodprøvene ble gitt for å tillate inkorporering av ekstraksjonstrinnene som ble brukt for å klargjøre gDNA som fungerer som den primære innmatingen for analysens arbeidsprosess.

Prøvens bestått-frekvens, definert som antall prøver som består kvalitetskontrollmetrikk på første forsøk, var 99,7 %. Alle resultater er basert på innledende testing.

PA for genotypenivå for alle varianter inkludert PolyTG/PolyT-varianten var 99,22 %, og uten PolyTG/PolyT-varianten var det 99,60 %. NA for alle WT var 99,70 %, og OA for alle rapporterte posisjoner var 99,70 %. PA for PolyTG/PolyT-varianten var 97,83 %.

Tabell 24 Reproduserbarhet for Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay (uten PolyTG/PolyT-varianter)

Prøve	HGVS-navn (eller plassering ved ingen HGVS)	Variantnavn	Totale resultater		Samsvarende betegnelser			Totalt* (alle steder)		% samsvar
			Per sted	Alle steder	Sted 1	Sted 2	Sted 3	Ingen betegnelser [€]	Feilbetegnelser	
1	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
1	c.1646G>A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
1	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1581A>G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1680-1G>A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.3870A>G	P1290P	6	18	6	5	6	0	1	94,44
2	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1477C>T	Q493X	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100

Prøve	HGVS-navn (eller plassering ved ingen HGVS)	Variantnavn	Totale resultater		Samsvarende betegnelser			Totalt* (alle steder)		% samsvar
			Per sted	Alle steder	Sted 1	Sted 2	Sted 3	Ingen betegnelser [€]	Feilbetegnelser	
3	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
4	c.1408G>A	V470M	6	18	5	6	6	1	0	94,44
4	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	5	6	6	1	0	94,44
4	c.2052delA	2184delA	6	18	5	6	6	1	0	94,44
5	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.224G>A	R75Q	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.2562T>G	T854T	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.3472C>T	R1158X	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.366T>A	Y122X	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.625G>T	A209S	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
6	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.2051_2052delAAinsG	2183AA>G	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.223C>T	R75X	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.3846G>A	W1282X	6	18	6	5	6	0	1*	94,44
9	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100

Prøve	HGVS-navn (eller plassering ved ingen HGVS)	Variantnavn	Totale resultater		Samsvarende betegnelser			Totalt* (alle steder)		% samsvar
			Per sted	Alle steder	Sted 1	Sted 2	Sted 3	Ingen betegnelser [€]	Feilbetegnelser	
10	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.3140-26A>G	3272-26A>G	6	18	6	5	6	0	1*	94,44
10	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
11, 39	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.2002C>T	R668C	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2988+1G>A	3120+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.489+1G>T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
13	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.178G>T	E60X	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100

Prøve	HGVS-navn (eller plassering ved ingen HGVS)	Variantnavn	Totale resultater		Samsvarende betegnelser			Totalt* (alle steder)		% samsvar
			Per sted	Alle steder	Sted 1	Sted 2	Sted 3	Ingen betegnelser [€]	Feilbetegnelser	
15	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.3080T>C	I1027T	6	18	6	6	6	0	0	100
17, 41	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
17, 41	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
17, 41	c.3528delC	3659delC	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.-4G>C	117120145	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.350G>A	R117H	12	36	12	12	12	0	0	100
19	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
19	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
19	c.579+1G>T	711+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
20, 43	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.254G>A	G85E	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.489+1G>T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1364C>A	A455E	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
22	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1679G>C	R560T	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100

Prøve	HGVS-navn (eller plassering ved ingen HGVS)	Variantnavn	Totale resultater		Samsvarende betegnelser			Totalt* (alle steder)		% samsvar
			Per sted	Alle steder	Sted 1	Sted 2	Sted 3	Ingen betegnelser [€]	Feilbetegnelser	
23	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.3276C>A	Y1092X (C>A)	6	18	6	6	6	0	0	100
24, 45	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
24, 45	c.3909C>G	N1303K	12	36	12	12	12	0	0	100
24, 45	c.4046G>A	G1349D	12	36	12	12	12	0	0	100
25	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
25	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
27, 46	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1652G>A	G551D	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1657C>T	R553X	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
28	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.91C>T	R31C	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100

Prøve	HGVS-navn (eller plassering ved ingen HGVS)	Variantnavn	Totale resultater		Samsvarende betegnelser			Totalt* (alle steder)		% samsvar
			Per sted	Alle steder	Sted 1	Sted 2	Sted 3	Ingen betegnelser [€]	Feilbetegnelser	
30	c.3485G>T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.1585-1G>A	1717-1G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.3484C>T	R1162X	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.1000C>T	R334W	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	6	18	6	6	6	0	0	100
35	c.1523T>G	F508C	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.254G>A	G85E	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.3454G>C	D1152H	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1007T>A	I336K	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.3705T>G	S1235R	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100

Prøve	HGVS-navn (eller plassering ved ingen HGVS)	Variantnavn	Totale resultater		Samsvarende betegnelser			Totalt* (alle steder)		% samsvar
			Per sted	Alle steder	Sted 1	Sted 2	Sted 3	Ingen betegnelser [€]	Feilbetegnelser	
38	c.1727G>C	G576A	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2002C>T	R668C	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2057C>A	S686Y	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
47, 85	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2657+5G>A	2789+5G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
48, 86	c.54-5940_273+10250del21kb	CFTRdele2,3	12	36	12	11	12	1	0	97,22
48, 86	c.1408G>A	V470M	12	36	12	11	12	1	0	97,22
48, 86	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	11	12	1	0	97,22
49, 87	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1766+1G>A	1898+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.220C>T	R74W	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.3808G>A	D1270N	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.2012delT	2143delT	12	36	12	12	12	0	0	100
52	c.3744delA	3876delA	6	18	6	6	6	0	0	100
53, 90	c.3773_3774insT	3905insT	12	36	12	12	12	0	0	100
54, 91	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
54, 91	c.262_263delTT	394delTT	12	36	12	12	12	0	0	100

Prøve	HGVS-navn (eller plassering ved ingen HGVS)	Variantnavn	Totale resultater		Samsvarende betegnelser			Totalt* (alle steder)		% samsvar
			Per sted	Alle steder	Sted 1	Sted 2	Sted 3	Ingen betegnelser [€]	Feilbetegnelser	
55, 92	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1519A>G	I507V	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.3080T>C	I1027T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
56	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.3154T>G	F1052V	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.3209G>A	R1070Q	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.2991G>C	L997F	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.3205G>A	G1069R	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.617T>G	L206W	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.2260G>A	V754M	6	18	6	6	6	0	0	100

Prøve	HGVS-navn (eller plassering ved ingen HGVS)	Variantnavn	Totale resultater		Samsvarende betegnelser			Totalt* (alle steder)		% samsvar
			Per sted	Alle steder	Sted 1	Sted 2	Sted 3	Ingen betegnelser [€]	Feilbetegnelser	
61	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.988G>T	G330X	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1040G>A	R347H	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
65	c.948delT	1078delT	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.532G>A	G178R	6	18	6	6	6	0	0	100
67	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
67	c.1647T>G	S549R (c.1647T>G)	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1646G>A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
69	c.2506G>T	D836Y	6	18	6	6	6	0	0	100
69	c.2537G>A	W846X	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.3485G>T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100

Prøve	HGVS-navn (eller plassering ved ingen HGVS)	Variantnavn	Totale resultater		Samsvarende betegnelser			Totalt* (alle steder)		% samsvar
			Per sted	Alle steder	Sted 1	Sted 2	Sted 3	Ingen betegnelser [€]	Feilbetegnelser	
71	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.274G>T	E92X	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
72	c.1022_1023insTC	1154insTC	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
73	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1826A>G	H609R	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	0	1	94,44
74	c.1429C>T	P477S	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
75	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
75	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
75	c.1721C>A	P574H	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
76	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.425delT	F143LfsX10	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1364C>A	A455E	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100

Prøve	HGVS-navn (eller plassering ved ingen HGVS)	Variantnavn	Totale resultater		Samsvarende betegnelser			Totalt* (alle steder)		% samsvar
			Per sted	Alle steder	Sted 1	Sted 2	Sted 3	Ingen betegnelser [€]	Feilbetegnelser	
78	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1581A>G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1680-1G>A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.3870A>G	P1290P	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.220C>T	R74W	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.3808G>A	D1270N	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1657C>T	R553X	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.-4G>C	11720145	6	18	6	6	6	0	0	100

Prøve	HGVS-navn (eller plassering ved ingen HGVS)	Variantnavn	Totale resultater		Samsvarende betegnelser			Totalt* (alle steder)		% samsvar
			Per sted	Alle steder	Sted 1	Sted 2	Sted 3	Ingen betegnelser [€]	Feilbetegnelser	
83	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.350G>A	R117H	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
Totalt, alle varianter (PA)** (inkludert PolyTG/PolyT-data i Tabell 25)			2580	7740	2562	2553	2565	37	23	99,22
Totalt, alle WT (NA)			2 871 132	8 613 396	2 865 930	2 855 526	2 865 932	26 006	2	99,70
Totalt, alle WT og varianter (OA)			2 873 712	8 621 136	2 868 492	2 858 079	2 868 497	26 043	25	99,70

[€] Prøver ble ikke testet på nytt.

[^] Ett replikat hver av prøve 5 og 75 hadde en betegnesfrekvens på 0 %. Videre undersøkelser indikerte at prøvene sannsynligvis ikke hadde blitt tilsatt i prøveplaten for bibliotekklargjøring.

* Ved gjennomgang ble prøve 9 og 10 sannsynligvis byttet om av operatøren før bibliotekklargjøring.

** Uten PolyTG/PolyT-varianter var PA 99,60 %.

Tabell 25 PolyTG/PolyT-reproduserbarhet for Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

Panel	Prøve	Genotype	Antall resultater		Samsvarende betegnelser			Totalt, alle steder		% samsvar
			Per sted	Alle steder	Sted 1	Sted 2	Sted 3	Ingen betegnelser	Feilbetegnelser	
A	1	(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	2	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	3	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	4	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
A	5	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	5	6	1	0	94,44 %
A	6	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	7	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	8	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	9	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %

Panel	Prøve	Genotype	Antall resultater		Samsvarende betegnelser			Totalt, alle steder		% samsvar
			Per sted	Alle steder	Sted 1	Sted 2	Sted 3	Ingen betegnelser	Feilbetegnelser	
A	10	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	11, 39	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	12, 40	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	13	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	14	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	15	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	5	6	1	0	94,44 %
A	16	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	17, 41	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	18, 42	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	19	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	20, 43	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	21, 44	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	22	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	23	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	24, 45	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	25	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	26	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	27, 46	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	12	36	11	12	12	0	1	97,22 %
A	28	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	29	(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	4	4	4	0	77,78 %
A	30	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	31	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	32	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	33	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
A	34	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	35	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	36	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %

Panel	Prøve	Genotype	Antall resultater		Samsvarende betegnelser			Totalt, alle steder		% samsvar
			Per sted	Alle steder	Sted 1	Sted 2	Sted 3	Ingen betegnelser	Feilbetegnelser	
A	37	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	38	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	47, 85	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	48, 86	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	11	11	12	2	0	94,44 %
B	49, 87	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	50, 88	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	51, 89	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	52	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	53, 90	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	54, 91	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	55, 92	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	56	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	57	(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	58	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	59	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
B	60	(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	61	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	62	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
B	63	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	64	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
B	65	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	66	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	67	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	68	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	69	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	70	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	71	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %

Panel	Prøve	Genotype	Antall resultater		Samsvarende betegnelser			Totalt, alle steder		% samsvar
			Per sted	Alle steder	Sted 1	Sted 2	Sted 3	Ingen betegnelser	Feilbetegnelser	
B	72	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	5	6	5	2	0	88,89 %
B	73	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	74	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	75	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	5	6	1	0	94,44 %
B	76	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	77	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	78	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
B	79	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	80	(TG)11(T)7/(TG)11(T)9	6	18	0	0	0	0	18*	0%
B	81	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	82	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	83	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	84	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
Total PolyTG/PolyT-varianter (PA)			552	1656	537	540	543	17	19	97,83 %

* Alle 18 prøver samsvarte med hverandre, men var diskordante med toveis Sanger-sekvensering.

DNA-ekstraksjon

Tre vanlig brukte, kommersielt tilgjengelige ekstraksjonsmetoder som representerte magnetkuleekstraksjon, alkoholutfelling og kvartfilter-kolonnisolasjon ble evaluert ved hjelp av K₂EDTA-antikoagulert fullblod. Totalt 14 blodprøver ble brukt under studien – to var villtype, mens de gjenværende prøvene bar unike genotyper som representerte ni forskjellige varianter, inkludert både vanlige og sjeldne varianter. For polyTG/polyT-variasjonen ble prøver med (T)5-9 og (TG)10-12 inkludert. De tre DNA-ekstraksjonsmetodene ble testet uavhengig av to forskjellige operatører som hver utførte tre kjøring per ekstraksjonsmetode. Hver ekstraksjon ble utført av hver operatør på ulike dager. DNA-konsentrasjonen og A260/A280-forholdet i de ekstraherte gDNA-prøvene ble bestemt med spektrofotometri. Den totale prøvestørrelsen for hver ekstraksjonsmetode i denne studien var 168 (14 prøver x 2 operatører/ekstraksjonsmetode x 3 kjøring/operatør x 2 replikater / ekstrahert gDNA-prøve).

Ekstraksjonsmetode	Antall prøver som ble testet	Betegnelsesfrekvens	Nøyaktighet	Prøvens første bestått-frekvens*
Alkoholutfelling	168	> 99,99 %	> 99,99 %	100 %
Kvartfilter-kolonnisolasjon	168	> 99,99 %	> 99,99 %	100 %
Magnetkuleekstraksjon	168	> 99,99 %	> 99,99 %	100 %

* Prosent prøver som hadde betegnelsesfrekvens på > 99 % i første kjøring.

DNA-innmating

DNA-innmatingsområdet for Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay ble evaluert ved å utføre en seriell fortynningsstudie ved hjelp av 14 representative DNA-prøver som inneholdt 16 unike CF-varianter. Hver prøve ble testet i duplikat på 9 DNA-innmatingsnivåer fra 1250 ng til 1 ng (1250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng og 1 ng). For bestemmelse av nøyaktighet ble prøvenes genotyper sammenlignet med toveis Sanger-sekvenseringsdata, og delesjonene ble sammenlignet med PCR-analyse. 1250 ng og 25 ng ble identifisert som henholdsvis øvre og nedre grense for DNA-innmating, ettersom de hadde ≥ 95 % bestått-frekvens ved første prøvekjøring uten feil betegnelser (100 % nøyaktighet og betegnelsesfrekvens).

DNA-innmatinger på 1250 ng, 250 ng og 100 ng ble videre testet med 4 representative DNA-prøver og minst 20 replikater per DNA-innmatingsnivå for hver prøve (n = 4x20 = 80 prøver), mens den nedre grensen på 25 ng ble testet med 14 prøver, 20 replikater for hver prøve (n = 14x20 = 280 prøver). Nøyaktigheten og prøvens første bestått-frekvens var 100 % på alle DNA-innmatingsnivåer.

Forstyrrende stoffer

For å vurdere virkningen av forstyrrende stoffer på Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis-systemet ble resultatene av analysen evaluert i nærvær og fravær av potensielle forstyrrende stoffer. Seksten fullblodsprøver med unike CF-genotyper ble testet i studien. Fire endogene forstyrrende stoffer (bilirubin, kolesterol, hemoglobin og triglyserider) ble testet ved å tilsette dem i blodprøver før DNA-ekstraksjon. Konsentrasjonsgrensene for hvert stoff vises i tabellen som følger. For å vurdere forstyrrelse fra blodprøvetaking (kort prøvetaking) ble EDTA tilsatt i blodprøver, og for å vurdere forstyrrelse som resulterte fra prøveklargjøring, ble den endelige vaskebufferen fra en kvartfilter-kolonnisolasjonsmetode tilsatt i rensed genomisk DNA.

Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay oppnådde 100 % betegnelsesfrekvens for alle prøvene som ble testet, og 100 % reproducerbarhet i genotypebetegnelser mellom prøver i nærvær og fravær av forstyrrende stoffer. Ingen forstyrrelse ble observert fra noen av de endogene eller eksogene forstyrrende stoffene.

For å vurdere virkningen av multipleksing indeksprimerforstyrrelse ble det utført en krysskontaminasjonsstudie med to prøver, hver med unike homozygote genotyper i fire forskjellige genomiske posisjoner, og to respektive indeksprimere. Ingen endring ble observert i variantbetegnelser med kontaminasjonsnivåer < 40 %.

Prøvegenotypen ble heterozygot når kontaminasjonsnivåer var ≥ 40 %.

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

Ytelseekvivalens med Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay (TruSight CFCS) bruker samme arbeidsprosess for bibliotekklargjøring som Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis Assay (MiSeqDx CFCS). TruSight CFCS bruker MiSeqDx Reagent Kit v3, mens MiSeqDx CFCS bruker sekvenseringsreagenser som følger med analysen. For å vise ekvivalens mellom TruSight CFCS og MiSeqDx CFCS ble resultater fra ni TruSight CFCS-kjøringer sammenlignet med en enkelt MiSeqDx CFCS-kjøring som gullstandarden. TruSight CFCS-kjøringer ble utført ved 96 prøvegjennomløp (maksimalt prøvegjennomløp for TruSight CFCS) og MiSeqDx CFCS ved 48 prøvegjennomløp (maksimalt prøvegjennomløp for MiSeqDx CFCS). Kilder til variabilitet for TruSight CFCS-kjøringer omfattet tre bibliotekklargjøringshendelser (hver med en unik lot av TruSight Cystic Fibrosis), tre operatører, tre MiSeqDx-instrumenter og tre loter av MiSeqDx Reagent Kit v3.

Variantbetegnelser fra TruSight CFCS-kjøringer ble sammenlignet med betegnelser utført ved MiSeqDx CFCS-kjøringen. 47 unike prøver var inkludert i hver TruSight CFCS-kjøring, med 2–3 replikater per prøve (95 DNA-prøver og 1 NTC per kjøring). For MiSeqDx CFCS-kjøringen ble de samme 47 prøvene sekvensert i singlikat (47 DNA-prøver + 1 NTC per kjøring). Prøvepanelet besto av Coriell DNA-prøver ekstrahert fra udødeliggjorte cellelinjer, og omfattet prøver som representerte hvert allel av ACMG 23-mutasjonene, delesjon/insersjon-varianter (inkludert insersjon/delesjoner i homopolymeriske regioner og insersjon-med-delesjon i den samme regionen), homozygote varianter, heterozygote forbindelsesvarianter, én av de målrettede store delesjonene, PolyTG/PolyT-varianter, enkle nukleotidvarianter og en prøve uten påviste varianter. Sammendrag av resultater etter genotype er oppgitt i [Tabell 26](#). Samsvar mellom analyser etter varianttype presenteres i [Tabell 27](#). Samlet (totalt) samsvar mellom analyser var > 99,99 %.

Tabell 26 Variantbetegnende ytelse for TruSight CFCS-Variant Assay sammenlignet med MiSeqDx CFCS-Variant Assay

		MiSeqDx CF Clinical Assay				
		HOM-variant	HET-variant	Villtype	Ingen betegnelse	Totalt
TruSight CF Clinical Assay	HOM-variant	551	–	–	–	551
	HET-variant	–	2664	–	–	2664
	Villtype	–	–	4 426 182	–	4 426 182
	Ingen betegnelse	–	–	58	–	58
	Totalt	551	2664	4 426 420	–	4 429 455

Tabell 27 Ytelse etter varianttype for TruSight CF Clinical Sequencing Assay sammenlignet med MiSeqDx CF Clinical Sequencing Assay

Varianttype	Riktige betegnelser	Feil betegnelser	Ingen betegnelser	Samsvar med MiSeqDx CF Clinical Sequencing Assay
SNV	2684	0	0	100,00 % (2684/2684)
DEL	18	0	0	100,00 % (18/18)
DIV	513	0	0	100,00 % (513/513)
PolyTG/PolyT	847	1	3	99,88 % (847/851)
Ingen (villtype)	4 426 182	0	58	100,00 % (4 426 182/4 426 240)
Totalt	4 430 244	1	61	>99,99 % (4 430 244/4 430 306)

En enkelt diskordant betegnelse ble observert mellom TruSight CFCS og MiSeqDx CFCS. Den spesifikke feilbetegnelsen var en PolyTG/PolyT-variant. Sammendrag av PolyTG/PolyT-samsvar er oppgitt i **Tabell 28 på side 88**.

Tabell 28 PolyTG/PolyT-variantbetegnende ytelse for TruSight CF Clinical Sequencing Assay sammenlignet med MiSeqDx CF Clinical Sequencing Assay

		Tabell over MiSeqDx CF Clinical Assay											Ingen betegnelse	Totalt
		(TG)10 (T)7/ (TG)10 (T)7	(TG)10 (T)7/ (TG)10 (T)9	(TG)10 (T)7/ (TG)12 (T)5	(TG)10 (T)7/ (TG)12 (T)7	(TG)10 (T)9/ (TG)10 (T)9	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	(TG)11 (T)7/ (TG)10 (T)7	(TG)11 (T)7/ (TG)10 (T)9	(TG)11 (T)7/ (TG)11 (T)7	(TG)11 (T)7/ (TG)12 (T)7	(TG)12 (T)5/ (TG)12 (T)5		
TruSight CF Clinical Assay	(TG)10(T)7/ (TG)10(T)7	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
	(TG)10(T)7/ (TG)10(T)9	-	189	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	189
	(TG)10(T)7/ (TG)12(T)5	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18
	(TG)10(T)7/ (TG)12(T)7	-	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-	-	18
	(TG)10(T)9/ (TG)10(T)9	-	-	-	-	72	-	-	-	-	-	-	-	72
	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-	17
	(TG)11(T)7/ (TG)10(T)7	-	-	-	-	-	-	126	-	-	-	-	-	126
	(TG)11(T)7/ (TG)10(T)9	-	-	-	-	-	-	-	249	-	-	-	-	249
	(TG)11(T)7/ (TG)11(T)7	-	-	-	-	-	-	-	-	72	-	-	-	72
	(TG)11(T)7/ (TG)12(T)7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36	-	-	36
	(TG)12(T)5/ (TG)12(T)5	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
	Ingen betegnelse	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3
Totalt		50	189	18	18	72	18	126	252	72	36	-	-	851

Referanser

- 1 Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, et al. (2004) Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genetics in Medicine* 6(5): 387–391.
- 2 Committee on Genetics. (April 2011) The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee Opinion. Update on Carrier Screening for Cystic Fibrosis 486: 1–4.
- 3 Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, Farrell PM. (2002) Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations—Correlation With Incidence Data and Application to Screening. *Human Mutation* 19:575–606.
- 4 Moskowitz SM, Chmiel JF, Steman DL, Cheng E, Gibson RL, et al. (2008) Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genetics in Medicine* 10(12):851–868.
- 5 Moskowitz SM, Chmiel JF, Stemen DL, Cheng E, Cutting GR. CFTR-related disorders. Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington; 2008. Tilgjengelig på www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250. [Online] Updated Feb 19, 2008.
- 6 Katkin JP. (2012) Cystic fibrosis: Clinical manifestations and diagnosis. Tilgjengelig på www.uptodate.com. [Online] December 07, 2012.
- 7 Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, et al. 2008 Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 153(2):S4–S14.
- 8 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2010.
- 9 Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). Tilgjengelig på www.genet.sickkids.on.ca/app. [Online] August 2013.
- 10 Rohlf EM, Zhou Z, Heim R, Nagan N, Rosenblum L, et al. (2011) Cystic Fibrosis Carrier Testing in an Ethnically Diverse US Population. *Clinical Chemistry*; 57(6): 841–848.
- 11 Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). Tilgjengelig på www.cftr2.org. [Online] August 2013.
- 12 The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) Project. Tilgjengelig på www.nacconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf. [Online] Presented by Garry Cutting on behalf of the CFTR2 Project at the 25th Annual North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC) sponsored by the Cystic Fibrosis Foundation. November 04, 2011. Anaheim, CA.
- 13 Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, et al. (2013) Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nature Genetics* 45 (10): 1160–1167.
- 14 Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. (March/April 2001) Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. *Genetics in Medicine* 3(2): 149–154.
- 15 Castellani C, Cuppens H, Macek H Jr, Cassiman JJ, Kerem E, et al. (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cystic Fibrosis* 7:179–196.
- 16 Pratt VM, Caggana M, Bridges C, Buller AM, DiAntonio L, et al. (May 2009) Development of Genomic Reference Materials for Cystic Fibrosis Genetic Testing. *Journal of Molecular Diagnostics* 11(3): 186–193.
- 17 Amos J, Feldman GL, Grody WW, Monaghan K, Palomaki GE, et al. (2008 Edition, Revised 03/2011) American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Clinical Genetic Laboratories.
- 18 Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine*. *Genetics in Medicine* 15(9): 733–747.

Revisjonshistorikk

Dokument	Dato	Beskrivelse av endring
Dokumentnr. 1000000097720 v03	Mai 2022	<ul style="list-style-type: none"> • Oppdaterte innhold i hele dokumentet for å ta hensyn til MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (katalognr. 20063860) og dets arbeidsprosess. • Opprettet underavsnittet Prøveklargjøring i delen med prosedyremerknader, og flyttet informasjon om DNA-ekstraksjon og kvantitering til dette underavsnittet. • La til en del med advarsel og forholdsregler for å rapporterte alvorlige hendelser knyttet til dette produktet til Illumina og ansvarlige myndigheter i medlemslandet. • La til en del om sammendrag over sikkerhet og ytelse med enkel UDI-DI i delen om produktmerking. • Korrigerte plasseringen av ikonet TM i produktoversikten. • Oppdaterte ikoner for merknad, forsiktig og advarsel. • Fylte ut tabell for revisjonslogg.
Dokumentnr. 1000000097720 v02	August 2021	La til tabell for revisjonslogg. Oppdatert adresse for EU-autorisert representant.
Dokumentnr. 1000000097720 v01	Juni 2020	La til nytt delenummer 20037124 for MiSeqDx Reagent Kit v3.
Dokumentnr. 1000000097720 v00	Mars 2020	Første versjon.

Patenter og varemerker

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

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

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

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

© 2022 Illumina, Inc. Med enerett.

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

AMPure, Beckman og Beckman Coulter er varemerker eller registrerte varemerker for Beckman Coulter, Inc.

Kontaktinformasjon



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



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

Australsk sponsor

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

Produktmerking

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

Du finner et sammendrag over sikkerhet og ytelse (SSP) på <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, etter oppstart av Eudamed (Europeisk database over medisinsk utstyr). Det er knyttet til enkel UDI-DI (0081627002CYSTFIB8C).