

# MiSeqDx<sup>®</sup>-Gerät für Geräte mit Dual-Boot-Konfiguration

FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Katalog-Nr. DX-410-1001

## Verwendungszweck

Das Illumina MiSeqDx-Gerät ist ein Sequenzierungsgerät, das Fluoreszenzsignale markierter Nukleotide mittels gerätespezifischer Reagenzien und Fließzellen (MiSeqDx Universal-Kit 1.0), Bildgebungshardware und Datenanalysesoftware misst. Die MiSeqDx-Plattform ist für die gezielte Sequenzierung humangenomischer DNA aus peripheren Vollblutproben vorgesehen. Die MiSeqDx-Plattform ist nicht für die Gesamtgenom- oder De-Novo-Sequenzierung vorgesehen.

## Verfahrensprinzipien

Das Illumina MiSeqDx ist für die gezielte Resequenzierung humangenomischer DNA aus peripheren Vollblutproben unter Verwendung von von Illumina bereitgestellten Verbrauchsmaterialien vorgesehen. Die genomische DNA wird im Rahmen der Bibliotheksvorbereitungsschritte verarbeitet, die mithilfe der anwendungsspezifischen, vom Benutzer entwickelten Oligonukleotide bestimmte genomische Regionen jeder Probe amplifizieren und zudem den amplifizierten Produkten die Indizes und Erfassungssequenzen für Fließzellen beifügen. Die Bibliotheksvorbereitung umfasst vier Schritte: Hybridisierung, Extension-Ligation, PCR-Amplifikation und Bibliotheksnormalisierung. Die daraus resultierenden normalisierten Probenbibliotheken sind für die Sequenzierung auf dem Illumina MiSeqDx-Gerät unter Verwendung der Chemie zur Sequenzierung durch Synthese (SBS) bereit. Die SBS-Chemie verwendet eine Methode mit reversiblen Terminatoren, um einzelne Nukleotidbasen zu erkennen, die in wachsende DNA-Stränge eingebaut sind. Die Echtzeitanalyse-Software (RTA) führt die Bildanalyse sowie das Base-Calling durch und weist jeder Base für jeden Sequenzierungszyklus einen Qualitäts-Score zu. Wenn die primäre Analyse abgeschlossen ist, verarbeitet die MiSeq Reporter Software auf dem MiSeqDx-Gerät Base-Calls über die Sekundäranalyse. Letztere umfasst die Demultiplexierung, die FASTQ-Dateigenerierung, das Alignment, das Varianten-Calling und das Generieren von VCF-Dateien, die Informationen zu Varianten enthalten, die an speziellen Positionen in einem Referenzgenom gefunden wurden.

## Einschränkungen des Verfahrens

- 1 Für *In-vitro*-Diagnostik.
- 2 Dieses Produkt beschränkt sich auf die Bereitstellung von Folgendem:
  - Sequenzierungsausgabe > 1 Gb
  - Reads > 3 Millionen
  - Read-Länge (bei Paired-End-Läufen) 2 x 150 bp
  - Basen höher als Q30 > 75 % (mehr als 75 % der Basen haben Qualitäts-Scores über 30 auf der Phred-Skala, was bedeutet, dass die Base-Call-Genauigkeit größer als 99,9 % ist)
- 3 Varianten in Homopolymerläufen, die mehr als acht Basen umfassen, werden in den VCF-Dateien herausgefiltert (R8-Filter).
- 4 Das System wurde für die Erkennung von SNVs und bis zu 3-Basen-Deletionen validiert. Die Auswertung von 1-Basen-Insertionen wurde auf drei unterschiedliche Insertionen auf drei separaten Chromosomen begrenzt.
- 5 Das System hat Probleme beim Erkennen von 1-Basen-Insertionen oder -Deletionen in Homopolymertrakten (z. B. polyA).
- 6 Das MiSeqDx-System ist darauf ausgelegt, qualitative (d. h. genotypische) Ergebnisse zu liefern.

- 7 Wie bei jedem auf Hybridisierung basierenden Workflow können zugrundeliegende Polymorphismen, Mutationen, Insertionen oder Deletionen in Oligonukleotid-bindenden Regionen die untersuchten Allele und somit die Anzahl der Calls beeinträchtigen.
- 8 Die empfohlene Mindestabdeckung pro Amplikon, die für ein genaues Varianten-Calling ( $Q(\max\_gt \mid \text{poly\_site}) \geq 100$ ) benötigt wird, beträgt 75x.

## Produktkomponenten

Das Illumina MiSeqDx besteht aus folgenden Komponenten:

- MiSeqDx-Gerät (Katalog-Nr. DX-410-1001)

Für den Betrieb des MiSeqDx und die Datenanalyse sind folgende Software-Komponenten erforderlich:

Software-Anwendung	Funktion	Beschreibung
MOS: MiSeqDx Operating Software	Steuert den Betrieb des Geräts.	Die MOS-Software-Anwendung verwaltet den Betrieb des Geräts während der Sequenzierung und generiert Bilder, die anschließend von der Echtzeitanalyse-Software (RTA) verwendet werden.
RTA: Echtzeitanalyse-Software (Real-Time Analysis)	Führt die Primäranalyse durch.	Die RTA-Software-Anwendung konvertiert die von der MOS für jede Platte pro Zyklus des Sequenzierungslaufs erzeugten Bilder in Base-Call-Dateien, die dann von der MiSeq Reporter Software verarbeitet werden. Die RTA-Softwareanwendung hat keine Benutzeroberfläche.
MiSeq Reporter	Führt die Sekundäranalyse durch.	Die MiSeq Reporter Software verarbeitet Base-Calls über die Sekundäranalyse. Letztere umfasst die Demultiplexierung, die FASTQ-Dateigenerierung, das Alignment, das Varianten-Calling und das Generieren von VCF-Dateien, die Informationen zu Varianten enthalten, die an speziellen Positionen in einem Referenzgenom gefunden wurden.

## Lagerung und Handhabung

Element	Spezifikation
Temperatur	Transport und Lagerung: -10 °C bis 40 °C Betriebsbedingungen: 19 °C bis 25 °C
Luftfeuchtigkeit	Transport und Lagerung: nicht kondensierende Feuchtigkeit Betriebsbedingungen: 30 bis 75 % relative Feuchtigkeit (nicht kondensierend)

## Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Geräte und Materialien

### Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien

MiSeqDx Universal-Kit 1.0 (Katalog-Nr. DX-103-1001)

### Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien

Stellen Sie sicher, dass die folgenden vom Benutzer bereitgestellten Verbrauchsmaterialien verfügbar sind, bevor Sie mit einem Lauf beginnen.

Verbrauchsmaterial	Zweck
Alkoholtupfer, 70 % Isopropyl oder Ethanol, 70 %	Reinigen des Fließzellenhalters
Labortücher, fusselfrei	Reinigen des Fließzellentisches

Verbrauchsmaterial	Zweck
Linsenpapier, 4 x 6 Zoll (10,2 x 15,2 cm)	Reinigen der Fließzelle
Tween 20	Waschen des Geräts
Pinzette, viereckige Spitze, Kunststoff (optional)	Entfernen der Fließzelle aus dem Versandbehälter
Wasser, Laborqualität	Waschen des Geräts

### Richtlinien für Wasser in Laborqualität

Verwenden Sie bei Geräteverfahren immer Wasser in Laborqualität. Verwenden Sie niemals Leitungswasser.

Die folgenden Beispiele sind geeignet:

- Illumina PW1
- 18 Megaohm (M $\Omega$ )-Wasser
- Milli-Q-Wasser
- Super-Q-Wasser
- Wasser in Molekularbiologie-Qualität

## Warn- und Vorsichtshinweise



### VORSICHT

Gemäß geltender Gesetze ist der Verkauf oder die Nutzung dieses Geräts nur über einen Arzt bzw. im Auftrag eines Arztes oder einer anderen Fachperson mit entsprechender Lizenz zulässig.

- 1 **Manche Komponenten der von Illumina bereitgestellten Reagenzien für die Verwendung mit dem MiSeqDx-Gerät enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Tragen Sie eine entsprechende für das Expositionsrisiko geeignete Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, Handschuhen und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften.** Umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern (SDS, Safety Data Sheet) unter [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html). (Weitere Informationen entnehmen Sie bitte den entsprechenden Produktbeilagen.)
- 2 Manche Komponenten der von Illumina bereitgestellten Reagenzien-Kits enthalten das Reduktionsmittel 2-Mercaptoethanol. (Weitere Informationen entnehmen Sie bitte den entsprechenden Produktbeilagen.) Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu Personenschäden kommen. Die Verwendung muss in einem gut belüfteten Bereich stattfinden und alle Behälter und nicht verwendeten Inhalte müssen gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften Ihrer Region entsorgt werden. Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich bitte an den technischen Support von Illumina.
- 3 Behandeln Sie alle Proben wie potenzielle Infektionserreger.
- 4 Wenn die beschriebenen Verfahren nicht eingehalten werden, kann dies zu fehlerhaften Ergebnissen oder einer wesentlichen Abnahme der Probenqualität führen.
- 5 Wenden Sie die routinemäßigen Vorsichtsmaßnahmen für das Labor an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Essen, trinken oder rauchen Sie nicht in ausgewiesenen Arbeitsbereichen. Tragen Sie bei der Handhabung von Proben und Kit-Reagenzien Einweg-Handschuhe und einen Laborkittel. Waschen Sie sich nach der Handhabung von Proben und Kit-Reagenzien gründlich die Hände.
- 6 Ordnungsgemäße Laborpraktiken und eine gute Laborhygiene sind unerlässlich, um eine Kontaminierung von Reagenzien, Instrumenten und genomischen DNA-Proben durch PCR-Produkte zu verhindern. Eine Kontaminierung durch PCR-Produkte kann zu falschen und unzuverlässigen Ergebnissen führen.
- 7 Stellen Sie zur Verhinderung einer Kontaminierung sicher, dass die Voramplifikations- und Nachamplifikationsbereiche über dafür vorgesehene Gerätschaften (z. B. Pipetten, Pipettenspitzen, Vortexer und Zentrifuge) verfügen.

- 8 Die Index-Proben-Paarung muss genau dem Probenblatt entsprechen. Abweichungen zwischen dem Probenblatt und dem Plattenlayout führen zu einem Verlust der positiven Probenidentifikation und fehlerhaften Ergebnisberichten.
- 9 Während des Bibliotheksnormalisierungsschritts des jeweiligen Reagenz ist es äußerst wichtig, das Bibliothek-Bead-Pellet vollständig zu resuspendieren. Dies ist unerlässlich, um eine einheitliche Clusterdichte auf der MiSeqDx-Fließzelle zu erzielen.
- 10 Halten Sie bei den Bibliotheksnormalisierungsschritten die in der Packungsbeilage des jeweiligen Reagenz angegebenen Inkubationszeiten ein. Eine unsachgemäße Inkubation kann die Bibliotheksdarstellung und die Clusterdichte beeinträchtigen.
- 11 Es wird dringend empfohlen, eine (vom Benutzer bereitzustellende) Virenschutz-Software zu installieren, um den Computer vor Viren zu schützen. Installationsanweisungen finden Sie im Benutzerhandbuch.
- 12 Betreiben Sie das MiSeqDx nicht, wenn irgendein Gehäuseteil entfernt wurde. Wenn Sie das Gerät betreiben, während eines oder mehrere Gehäuseteile entfernt sind, sind Sie möglicherweise Netz- und Gleichstromspannungen ausgesetzt.
- 13 Berühren Sie nicht den Fließzellentisch in der Fließzellenkammer. Das Heizelement in der Kammer arbeitet bei 22 °C bis 95 °C, sodass es zu Verbrennungen kommen kann.
- 14 Das Gerät wiegt etwa 57 kg und kann schwere Verletzungen verursachen, wenn es fallen gelassen oder falsch gehandhabt wird.

## Verfahrenshinweise

Der Durchsatz pro MiSeqDx-Lauf kann zwischen acht und 48 Proben betragen. Die während der PCR-Amplifikation verwendeten Index-Primer müssen auf Basis des gewünschten endgültigen Probendurchsatzes ausgewählt werden, damit Diversität in der Indexsequenz sichergestellt ist.



### HINWEIS

Um eine maximale Effizienz beim Durchsatz zu erzielen, führen Sie die Bibliotheksvorbereitung für bis zu 96 Proben durch und teilen Sie die Proben dann in zwei Sequenzierungsläufe mit maximal 48 Proben pro Lauf auf.

Das MiSeqDx verwendet eine grüne LED zum Sequenzieren von G/T-Basen und eine rote LED zum Sequenzieren von A/C-Basen. Um eine ordnungsgemäße Registrierung sicherzustellen, muss in jedem Zyklus mindestens eines der zwei Nukleotide für jeden Farbkanal gelesen werden. Es ist wichtig, die Farbbalance für jede Base des sequenzierten Index-Reads zu halten. Anderenfalls kann bei der Sequenzierung des Index-Reads ein Registrierungsfehler auftreten.

Wenn Sie weniger als 48 Proben in einem Sequenzierungslauf sequenzieren, wählen Sie die entsprechenden Indizes anhand ihrer Sequenzen aus, damit die Farbbalance in den grünen und roten Kanälen aufrechterhalten wird. Läufe mit acht bis 48 Proben müssen mindestens die Index-Primer-Kombinationen enthalten, die in der Packungsbeilage des MiSeqDx Universal-Kit 1.0 aufgeführt sind.

Um kleinere Läufe präzise zu verarbeiten, müssen mindestens acht Proben vorhanden sein. Wenn keine sechs eindeutigen Proben (ausgenommen die positiven und negativen Kontrollen) verfügbar sind, ist es akzeptabel, den Lauf mit Probenreplikaten von humangenomischen DNA-Proben aufzufüllen. In der Packungsbeilage des MiSeqDx Universal-Kit 1.0 ist der minimale Satz an Indizes mit Farbbalance angegeben, die für Sequenzierungsläufe mit acht Proben zu verwenden sind.

## Gebrauchsanweisung

Zur Verwendung des MiSeqDx-Geräts nach den folgenden Anweisungen sind Reagenzien erforderlich, die im MiSeqDx Universal-Kit 1.0 bereitgestellt werden.

### MiSeqDx-Probenblattvorbereitung

- 1 Wählen Sie im Begrüßungsbildschirm von Illumina Worklist Manager **Create Worklist** (Arbeitsliste erstellen).
- 2 Wählen Sie im Feld „Test Type“ (Testtyp) die Option **MiSeqDx Universal** aus.
- 3 Geben Sie im Feld „Worklist Name“ (Name der Arbeitsliste) einen Namen für das Probenblatt ein.

- Wenn für den Namen des Probenblatts die alphanumerische Barcode-ID der Reagenzienkartusche verwendet wird, findet die MiSeq Operating Software (MOS) das Probenblatt automatisch.
  - Wenn ein anderer Name für das Probenblatt verwendet wird, kann über die Schaltfläche **Browse** (Durchsuchen) in der MiSeq Operating Software (MOS) zum entsprechenden Probenblatt navigiert werden.
- 4 [Optional] Geben Sie eine Beschreibung für den Lauf ein.
  - 5 Stellen Sie sicher, dass das Datum mit dem Startdatum des Laufs übereinstimmt.
  - 6 Wählen Sie **Next** (Weiter).

### Eingeben von Probeninformationen

- 1 Geben Sie auf der Registerkarte „Table“ (Tabelle) oder „Plate“ (Platte) für jede Probe in einem Well die folgenden Informationen ein:
  - a **Sample ID** (Proben-ID): Geben Sie eine eindeutige Proben-ID ein.
  - b **Index 1 and Index 2** (Index 1 und Index 2): Geben Sie den Indexadapter an, der für jeden Index-Read verwendet werden soll.
  - c **Manifest**: Geben Sie den Namen der Manifestdatei an, die Informationen zu den Proben in diesem speziellen Well enthält.
- 2 [Optional] Um detailliertere Informationen zu den Proben aufzuzeichnen, geben Sie einen Probennamen und eine Beschreibung ein.
- 3 [Optional] Wählen Sie zum Angeben von Kontrollen auf der Platte im Dropdown-Menü **Control** (Kontrolle) die Option „Negative“ (Negativ) oder „Positive“ (Positiv) aus.
- 4 Wechseln Sie zur Registerkarte „Plate Graphic“ (Plattengrafik) und verwenden Sie die Option **Copy to Clipboard** (In Zwischenablage kopieren) oder **Print** (Drucken), um ein Bild der Probenplatte zu erfassen.
- 5 Wählen Sie **Finish** (Fertigstellen).

### Probenvorbereitung

Folgende Schritte sollten gemäß der Gebrauchsanweisung in der Packungsbeilage des MiSeqDx Universal-Kit 1.0 durchgeführt werden:

- Hybridisierung des Oligonukleotid-Pools
- Entfernen von ungebundenen Oligonukleotiden
- Extension-Ligation von gebundenen Oligonukleotiden
- PCR-Amplifikation
- PCR-Reinigung
- Bibliotheksnormalisierung
- Bibliotheks-Pooling

### Vorbereiten der Reagenzienkartusche

- 1 Tauen Sie die MiSeqDx-Reagenzienkartusche in einem Wasserbad auf, das ausreichend raumtemperiertes deionisiertes Wasser enthält, um die Basis der Reagenzienkartusche bis zur auf der Reagenzienkartusche aufgedruckten Wasserlinie einzutauchen. Das Wasser darf die maximale Wasserlinie nicht übersteigen.
- 2 Lassen Sie die Reagenzienkartusche im raumtemperierten Wasserbad etwa 1 Stunde bzw. so lange auftauen, bis sie vollständig aufgetaut ist.
- 3 Nehmen Sie die Kartusche aus dem Wasserbad und klopfen Sie sie vorsichtig auf dem Tisch ab, um das Wasser von der Basis der Kartusche zu entfernen. Trocknen Sie die Basis der Kartusche ab. Stellen Sie sicher, dass kein Wasser auf die Oberseite der Reagenzienkartusche gespritzt ist.

### Überprüfen der Reagenzienkartusche

- 1 Invertieren Sie die Reagenzienkartusche 10-mal, um die aufgetauten Reagenzien zu mischen, und überprüfen Sie, ob alle Positionen aufgetaut sind.

**HINWEIS**

Es ist äußerst wichtig, dass die Reagenzien in der Kartusche vollständig aufgetaut und gemischt sind, damit eine ordnungsgemäße Sequenzierung sichergestellt werden kann.

- 2 Überprüfen Sie die Reagenzien an den Positionen 1, 2 und 4, um sicherzugehen, dass sie vollständig gemischt und keine Ausfällungen enthalten sind.
- 3 Klopfen Sie die Kartusche vorsichtig auf den Tisch, um Luftblasen in den Reagenzien zu entfernen.

**HINWEIS**

Die MiSeqDx-Sipper-Röhrchen reichen bis zum Boden der einzelnen Behälter, um die Reagenzien zu aspirieren. Deshalb ist es wichtig, dass sich keine Luftblasen in den Behältern befinden.

- 4 Lagern Sie die Reagenzienkartusche auf Eis bzw. lagern Sie sie bei 2 °C bis 8 °C (bis zu 6 Stunden), bis Sie den Lauf konfigurieren können. Die besten Ergebnisse erzielen Sie, wenn Sie direkt mit dem Laden der Probe und dem Konfigurieren des Laufs fortfahren.

### Vorbereiten von Proben für die Sequenzierung

- 1 Fahren Sie mit einem **DAL**-Röhrchen für die Sequenzierung fort.
- 2 Wenn das **DAL**- Röhrchen gefroren aufbewahrt wurde, lassen Sie es vollständig auftauen, und mischen Sie es, indem Sie auf und ab pipettieren.
- 3 Fügen Sie dem **DAL**-Röhrchen 6 µl von 20 pM Interne PhiX-Kontrolle hinzu.
- 4 Pipettieren Sie 3- bis 5-mal auf und ab, um die Spitze zu spülen und eine vollständige Übertragung sicherzustellen.
- 5 Mischen Sie das **DAL**- Röhrchen mit dem Vortexer mit höchster Geschwindigkeit.
- 6 Zentrifugieren Sie das **DAL**-Röhrchen eine Minute lang bei 1000 x g und 20 °C.
- 7 Inkubieren Sie das **DAL**-Röhrchen bei 96 °C zwei Minuten lang auf einem Hitzeblock.
- 8 Invertieren Sie das **DAL**-Röhrchen nach der Inkubation ein- bis zweimal, um es gut zu mischen, und legen Sie es dann sofort in das Eiswasserbad.
- 9 Belassen Sie das **DAL**-Röhrchen 5 Minuten lang im Eiswasserbad.

**HINWEIS**

Führen Sie den Schritt der Hitzedenaturierung aus, unmittelbar bevor Sie das **DAL**- Röhrchen in die MiSeqDx-Reagenzienkartusche laden, um sicherzustellen, dass die Matrize optimal in die MiSeqDx-Fließzelle geladen wird.

### Laden der Probenbibliotheken in eine Kartusche

- 1 Verwenden Sie eine separate, saubere und leere 1-ml-Pipettenspitze, um die Verschlussfolie über dem mit **Load Samples** (Proben laden) bezeichneten Behälter auf der Reagenzienkartusche zu durchstechen.
- 2 Geben Sie mit der Pipette 600 µl der **DAL**-Probenbibliotheken in den Behälter **Load Samples** (Proben laden). Berühren Sie die Verschlussfolie nicht.
- 3 Überprüfen Sie nach dem Laden der Probe, ob sich Luftblasen im Behälter befinden. Falls Luftblasen vorhanden sind, klopfen Sie die Kartusche vorsichtig auf den Tisch, damit die Blasen entweichen.
- 4 Fahren Sie mit den Schritten zum Einrichten des Laufs über die Benutzeroberfläche der MiSeq Operating Software (MOS) fort.

### Laufkonfiguration

- 1 Melden Sie sich bei der MiSeq Operating Software (MOS) an.
- 2 Wählen Sie **Sequence** (Sequenzieren).  
Mehrere Laufkonfigurationsbildschirme öffnen sich in folgender Reihenfolge: „Load Flow Cell“ (Fließzelle laden), „Load Reagents“ (Reagenzien laden), „Review“ (Prüfen) und „Pre-Run Check“ (Selbsttest).
- 3 Wenn der Bildschirm „Load Flow Cell“ (Fließzelle laden) angezeigt wird, reinigen und laden Sie die Fließzelle.
- 4 Verschließen Sie den Fließzellenriegel und die Tür der Fließzellenkammer.

Sowohl der Riegel als auch die Tür der Kammer müssen verschlossen sein, bevor der Lauf gestartet werden kann. Nachdem die Fließzelle geladen wurde, liest die Software die RFID ein. In der rechten unteren Ecke des Bildschirms wird eine Bestätigung angezeigt, dass die RFID erfolgreich gelesen wurde.

- 5 Wenn der Bildschirm „Load Reagents“ (Reagenzien laden) angezeigt wird, leeren Sie die Abfallflasche, laden Sie die Flasche mit MiSeqDx SBS-Lösung (PR2) und laden Sie dann die Reagenzienkartusche.  
Wenn die Flasche mit der MiSeqDx SBS-Lösung (PR2) und die Reagenzienkartusche geladen werden, liest die Software die RFID ein. In der rechten unteren Ecke des Bildschirms wird eine Bestätigung angezeigt, dass die RFID erfolgreich gelesen wurde.
- 6 Wählen Sie das entsprechende Probenblatt aus.  
Standardmäßig sucht die Software nach einer Probenblattdatei, deren Name mit der Barcodenummer der im Gerät eingesetzten Reagenzienkartusche übereinstimmt.
- 7 Bestätigen Sie die Laufeinstellungen und die Ergebnisse des Selbsttests.
- 8 Starten Sie den Lauf.  
Wenn der Lauf beginnt, wird der Sequenzierungsbildschirm geöffnet. Dieser Bildschirm bietet eine visuelle Darstellung des aktuellen Laufs, einschließlich Intensitäten und Qualitäts-Scores (Q-Scores).

## Ergebnisse

Die integrierte Primäranalysesoftware (Echtzeitanalyse [RTA]) führt die Bildanalyse und das Base-Calling durch und weist jeder Base für jeden Sequenzierungszyklus einen Qualitäts-Score zu. Wenn die Primäranalyse abgeschlossen ist, beginnt die MiSeq Reporter Software auf dem MiSeqDx-Gerät mit der Sekundäranalyse, wie nachfolgend beschrieben.

### Demultiplexierung

Die Demultiplexierung ist der erste Schritt der Analyse, wenn im Probenblatt mehrere Proben aufgelistet sind und der Lauf über Index-Reads verfügt. Die Demultiplexierung trennt Daten von gepoolten Proben auf der Basis kurzer Indexsequenzen, die Proben aus verschiedenen Bibliotheken markieren. Jede Index-Read-Sequenz wird mit den im Probenblatt angegebenen Index-Sequenzen verglichen. In diesem Schritt werden keine Qualitätswerte berücksichtigt.

### Generieren von FASTQ-Dateien

Nach der Demultiplexierung generiert MiSeq Reporter temporäre Dateien im FASTQ-Format, dem Textformat für die Darstellung von Sequenzen. FASTQ-Dateien enthalten die Reads für jede Probe sowie die Qualitäts-Scores (ausgenommen Reads von Clustern, die den Filter nicht passiert haben). Der Qualitäts-Score Q wird berechnet als  $-10 \log_{10} P$ , wobei P die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der der Base-Call falsch ist.

### Alignment

Beim Alignment werden Sequenzen mit der Referenz verglichen, um eine Beziehung zwischen den Sequenzen zu identifizieren. Außerdem wird ein Score basierend auf Ähnlichkeitsregionen zugewiesen. Aligierte Reads werden in Dateien im BAM-Format gespeichert. Für das MiSeqDx Universal-Kit 1.0 verwendet MiSeq Reporter einen beschränkten („banded“) Smith-Waterman-Algorithmus, der lokale Sequenz-Alignments durchführt, um ähnliche Regionen zwischen zwei Sequenzen festzustellen.

### Varianten-Calling

Für das MiSeqDx Universal-Kit 1.0 verwendet MiSeq Reporter den Starling-Varianten-Caller, der Calls von SNPs und kleinen Indels durchführt und die Tiefe sowie die Wahrscheinlichkeiten für jede Stelle im Genom angibt. Starling erstellt Berichte über SNPs und Indels im HTML-Format sowie tabulatorgetrennte Textdateien, die Varianten im Varianten-Call-Format (VCF) enthalten. Informationen dazu, wie Ergebnisse aus VCF-Dateien berechnet werden können, finden Sie im *Benutzerhandbuch zu MiSeq Reporter (Dokument-Nr. 15039188)*.

## Leistungsmerkmale

### Genauigkeit

Zur Bewertung der Genauigkeit der MiSeqDx-Plattform wurden drei separate Studien durchgeführt.

#### Studie 1

Diese Studie verwendete einen zum Abfragen zahlreicher Gene entwickelten repräsentativen Assay, wobei 24.434 Basen über 19 unterschiedliche Chromosome hinweg abgedeckt werden und potenziell klinisch relevante Exons enthalten sind. Die in dieser Studie verwendeten 13 eindeutigen Proben stammen von zwei Eltern und 11 Kindern, die von mehreren Labors und anhand mehrerer Sequenzierungsmethoden regelmäßig sequenziert wurden. Es gibt sechs Proben von Frauen und sieben Proben von Männern. Die Genauigkeit für Einzelnukleotidvarianten (SNVs) wurde ermittelt, indem die Daten der Studie mit denen einer gut charakterisierten Referenzdatenbank verglichen wurden. Die Sequenz der Referenzdatenbank wurde aus der Kombination mehrerer Sequenzierungsmethoden, öffentlich zugänglicher Daten und Erbinformationen abgeleitet. Zum Untersuchen der Genauigkeit des Systems wurde die folgende Tabelle auf Basis von Daten aus dem ersten Lauf der Studie zusammengestellt. Für diese Studie wurden keine Wiederholungstests durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Studie werden nachfolgend dargestellt.



Tabelle 1 Studie 1: Genauigkeitsdaten auf Amplikon-Ebene für die MiSeqDx-Plattform

Amplikon	Chromosom	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl der eindeutigen Proben	Gesamtzahl analysierter Proben <sup>2</sup>	Anzahl der möglichen Calls pro Probe <sup>3</sup>	Anzahl der „No Calls“ <sup>4</sup>	Anzahl der korrekten Calls pro Probe <sup>5</sup>	Anzahl der falschen Calls <sup>6</sup>	% korrekte Calls <sup>7</sup>
1	1	132	Poly C (5), 63 % GC	13	15	132	0	132	0	100
2	1	128	Poly T (5)	13	15	128	0	128	0	100
3	2	133	-	13	15	133	0	133	0	100
4	2	119	-	13	15	119	0	119	0	100
5	2	127	Poly T (5)	13	15	127	0	127	0	100
6	2	135	Poly A (6)	13	15	135	0	135	0	100
7	2	122	Poly T (5), Poly C (5)	13	15	122	0	122	0	100
8	2	110	Poly T (5)	13	15	110	0	110	0	100
9 <sup>s</sup>	2	131	Poly A (14)	13	15	130–131	0	130–131	9	99,54
10	2	117	-	13	15	117	0	117	0	100
11	2	121	-	13	15	121	0	121	0	100
12	2	114	-	13	15	114	0	114	0	100
13	2	129	Poly A (5)	13	15	129	0	129	0	100
14	3	131	Poly A (5), Poly T (5)	13	15	131	0	131	0	100
15	3	130	-	13	15	130	0	130	0	100
16	3	130	-	13	15	130	0	130	0	100

Amplikon	Chromosom	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl der eindeutigen Proben	Gesamtzahl analysierter Proben <sup>2</sup>	Anzahl der möglichen Calls pro Probe <sup>3</sup>	Anzahl der „No Calls“ <sup>4</sup>	Anzahl der korrekten Calls pro Probe <sup>5</sup>	Anzahl der falschen Calls <sup>6</sup>	% korrekte Calls <sup>7</sup>
17	3	117	-	13	15	117	0	117	0	100
18	3	136	Poly T (5)	13	15	136	0	136	0	100
19	3	131	Poly T (5), SNV	13	15	131	0	131	0	100
20	3	123	Poly A (5)	13	15	123	0	123	0	100
21	3	117	Poly A (6), Poly T (5), Homologe Region auf einem anderen Chromosom	13	15	117	0	117	0	100
22	3	119	Homologe Region auf einem anderen Chromosom	13	15	119	0	119	0	100
23	3	120	-	13	15	120	0	120	0	100
24	3	129	Poly T (5)	13	15	129	0	129	0	100
25	4	133	Poly C (7), 66 % GC	13	15	133	0	133	0	100
26	4	135	Poly C (5), 69 % GC	13	15	135	0	135	0	100
27	4	123	SNV	13	15	123	0	123	0	100
28	4	134	-	13	15	134	0	134	0	100
29	4	132	-	13	15	132	0	132	0	100

Amplikon	Chromosom	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl der eindeutigen Proben	Gesamtzahl analysierter Proben <sup>2</sup>	Anzahl der möglichen Calls pro Probe <sup>3</sup>	Anzahl der „No Calls“ <sup>4</sup>	Anzahl der korrekten Calls pro Probe <sup>5</sup>	Anzahl der falschen Calls <sup>6</sup>	% korrekte Calls <sup>7</sup>
30	4	121	Poly A (5), SNV	13	15	121	0	121	0	100
31	4	125	-	13	15	125	0	125	0	100
32	4	134	Poly T (5)	13	15	134	0	134	0	100
33	4	118	-	13	15	118	0	118	0	100
34	4	122	Poly A (5)	13	15	122	0	122	0	100
35	4	131	-	13	15	131	0	131	0	100
36	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
37	4	128	Poly T (6)	13	15	128	0	128	0	100
38	4	131	-	13	15	131	0	131	0	100
39	4	129	Poly A (5), Poly T (5), SNV	13	15	129	0	129	0	100
40	4	133	Poly T (5), SNV	13	15	133	0	133	0	100
41	4	112	SNV	13	15	112	0	112	0	100
42	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
43	4	135	-	13	15	135	0	135	0	100
44	4	122	-	13	15	122	0	122	0	100
45	4	117	-	13	15	117	0	117	0	100

Amplikon	Chromosom	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl der eindeutigen Proben	Gesamtzahl analysierter Proben <sup>2</sup>	Anzahl der möglichen Calls pro Probe <sup>3</sup>	Anzahl der „No Calls“ <sup>4</sup>	Anzahl der korrekten Calls pro Probe <sup>5</sup>	Anzahl der falschen Calls <sup>6</sup>	% korrekte Calls <sup>7</sup>
46 <sup>9</sup>	4	124	-	13	15	125	0	125	0	100
47	4	117	Poly T (5)	13	15	117	0	117	0	100
48	4	128	Poly A (7)	13	15	128	0	128	0	100
49	4	123	Poly A (6)	13	15	123	0	123	0	100
50	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
51	4	112	-	13	15	112	0	112	0	100
52	4	129	-	13	15	129	0	129	0	100
53	4	126	-	13	15	126	0	126	0	100
54	4	132	-	13	15	132	0	132	0	100
55	5	131	-	13	15	131	0	131	0	100
56	5	119	-	13	15	119	0	119	0	100
57	5	120	Poly A (5)	13	15	120	0	120	0	100
58	5	119	-	13	15	119	0	119	0	100
59	5	118	-	13	15	118	0	118	0	100
60	5	112	-	13	15	112	0	112	0	100
61	5	120	-	13	15	120	0	120	0	100
62	5	120	Poly A (5)	13	15	120	0	120	0	100
63	5	115	CT(5)	13	15	115	0	115	0	100
64	5	112	SNV	13	15	112	0	112	0	100

Amplikon	Chromosom	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl der eindeutigen Proben	Gesamtzahl analysierter Proben <sup>2</sup>	Anzahl der möglichen Calls pro Probe <sup>3</sup>	Anzahl der „No Calls“ <sup>4</sup>	Anzahl der korrekten Calls pro Probe <sup>5</sup>	Anzahl der falschen Calls <sup>6</sup>	% korrekte Calls <sup>7</sup>
65	5	135	Poly T (6)	13	15	135	0	135	0	100
66	5	131	63 % GC	13	15	131	0	131	0	100
67	5	121	-	13	15	121	0	121	0	100
68	5	132	Poly A (6), Poly T (8)	13	15	132	0	132	0	100
69	7	133	-	13	15	133	0	133	0	100
70	7	120	60 % GC	13	15	120	0	120	0	100
71	7	135	-	13	15	135	0	135	0	100
72	7	126	Poly A (5), 59 % GC	13	15	126	0	126	0	100
73	7	134	-	13	15	134	0	134	0	100
74	7	122	Poly C (5), 63 % GC	13	15	122	0	122	0	100
75	7	127	59 % GC; SNV	13	15	127	0	127	0	100
76	7	123	-	13	15	123	0	123	0	100
77	7	125	-	13	15	125	0	125	0	100
78	7	133	Poly A (5), Poly T (5)	13	15	133	0	133	0	100
79	7	116	-	13	15	116	0	116	0	100
80	7	135	-	13	15	135	0	135	0	100

Amplikon	Chromosom	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl der eindeutigen Proben	Gesamtzahl analysierter Proben <sup>2</sup>	Anzahl der möglichen Calls pro Probe <sup>3</sup>	Anzahl der „No Calls“ <sup>4</sup>	Anzahl der korrekten Calls pro Probe <sup>5</sup>	Anzahl der falschen Calls <sup>6</sup>	% korrekte Calls <sup>7</sup>
81	7	118	-	13	15	118	0	118	0	100
82	7	136	67 % GC	13	15	136	0	136	0	100
83	7	131	58 % GC	13	15	131	0	131	0	100
84	7	119	Poly G (6), 61 % GC	13	15	119	0	119	0	100
85	7	122	Poly T (5)	13	15	122	0	122	0	100
86	7	123	Poly A (6)	13	15	123	0	123	0	100
87	8	127	60 % GC	13	15	127	0	127	0	100
88	8	129	57 % GC	13	15	129	0	129	0	100
89	9	130	Poly T (5)	13	15	130	0	130	0	100
90	9	116	-	13	15	116	0	116	0	100
91	9	119	Homologe Region auf einem anderen Chromosom	13	15	119	0	119	0	100
92	9	121	-	13	15	121	0	121	0	100
93	9	117	Homologe Region auf einem anderen Chromosom	13	15	117	0	117	0	100
94	9	114	-	13	15	114	0	114	0	100
95 <sup>10</sup>	9	129	Poly A (14)	13	15	130	0	129 (von 130)	15	99,23

Amplikon	Chromosom	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl der eindeutigen Proben	Gesamtzahl analysierter Proben <sup>2</sup>	Anzahl der möglichen Calls pro Probe <sup>3</sup>	Anzahl der „No Calls“ <sup>4</sup>	Anzahl der korrekten Calls pro Probe <sup>5</sup>	Anzahl der falschen Calls <sup>6</sup>	% korrekte Calls <sup>7</sup>
96	9	114	Homologe Region auf einem anderen Chromosom; SNV	13	15	114	0	114	0	100
97	9	122	-	13	15	122	0	122	0	100
98	9	127	Poly A (5), Poly C (5)	13	15	127	0	127	0	100
99	9	133	-	13	15	133	0	133	0	100
100	9	138	64 % GC	13	15	138	0	138	0	100
101	9	139	-	13	15	139	0	139	0	100
102	9	116	-	13	15	116	0	116	0	100
103	9	133	Poly A (5), 57 % GC	13	15	133	0	133	0	100
104	9	138	57 % GC	13	15	138	0	138	0	100
105	9	136	Poly C (5), 67 % GC	13	15	136	0	136	0	100
106	9	118	70 % GC	13	15	118	0	118	0	100
107	10	128	62 % GC	13	15	128	0	128	0	100
108	10	120	60 % GC	13	15	120	0	120	0	100
109	10	139	58 % GC; SNV	13	15	139	0	139	0	100
110	10	118	57 % GC	13	15	118	0	118	0	100

Amplikon	Chromosom	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl der eindeutigen Proben	Gesamtzahl analysierter Proben <sup>2</sup>	Anzahl der möglichen Calls pro Probe <sup>3</sup>	Anzahl der „No Calls“ <sup>4</sup>	Anzahl der korrekten Calls pro Probe <sup>5</sup>	Anzahl der falschen Calls <sup>6</sup>	% korrekte Calls <sup>7</sup>
111	10	123	Poly T (5)	13	15	123	0	123	0	100
112	10	121	-	13	15	121	0	121	0	100
113	10	129	26 % GC	13	15	129	0	129	0	100
114	10	122	-	13	15	122	0	122	0	100
115	10	124	Poly T (5); Homologe Region auf einem anderen Chromosom	13	15	124	0	124	0	100
116	10	135	CA(4)	13	15	135	0	135	0	100
117	10	135	Poly A (6); Homologe Region auf einem anderen Chromosom	13	15	135	0	135	0	100
118	10	119	Poly C (5); SNV	13	15	119	0	119	0	100
119	10	125	-	13	15	125	0	125	0	100
120	10	131	-	13	15	131	0	131	0	100
121	10	117	-	13	15	117	0	117	0	100
122	10	116	-	13	15	116	0	116	0	100
123	10	129	58 % GC	13	15	129	0	129	0	100
124	11	117	Poly T (10)	13	15	117	0	117	0	100
125	11	117	Poly T (5)	13	15	117	0	117	0	100



Amplikon	Chromosom	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl der eindeutigen Proben	Gesamtzahl analysierter Proben <sup>2</sup>	Anzahl der möglichen Calls pro Probe <sup>3</sup>	Anzahl der „No Calls“ <sup>4</sup>	Anzahl der korrekten Calls pro Probe <sup>5</sup>	Anzahl der falschen Calls <sup>6</sup>	% korrekte Calls <sup>7</sup>
126	11	113	Poly A (5)	13	15	113	0	113	0	100
127	11	129	-	13	15	129	0	129	0	100
128	11	121	Poly T (5)	13	15	121	0	121	0	100
129	11	123	-	13	15	123	0	123	0	100
130	11	127	Poly A (6)	13	15	127	0	127	0	100
131	11	136	Poly T (6)	13	15	136	0	136	0	100
132	11	132	Poly T (5)	13	15	132	0	132	0	100
133	11	115	-	13	15	115	0	115	0	100
134	11	117	Poly T (8); 19 % GC	13	15	117	0	117	0	100
135	11	134	Poly A (5); Poly T (5)	13	15	134	0	134	0	100
136	11	131	Poly A (5)	13	15	131	0	131	0	100
137	11	133	26 % GC; SNV	13	15	133	0	133	0	100
138	11	137	Poly T (8); SNV	13	15	137	0	137	0	100
139	11	131	Poly A (5)	13	15	131	0	131	0	100
140	12	131	-	13	15	131	0	131	0	100
141	12	128	-	13	15	128	0	128	0	100

Amplikon	Chromosom	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl der eindeutigen Proben	Gesamtzahl analysierter Proben <sup>2</sup>	Anzahl der möglichen Calls pro Probe <sup>3</sup>	Anzahl der „No Calls“ <sup>4</sup>	Anzahl der korrekten Calls pro Probe <sup>5</sup>	Anzahl der falschen Calls <sup>6</sup>	% korrekte Calls <sup>7</sup>
142	12	133	Poly A (5)	13	15	133	0	133	0	100
143	12	136	-	13	15	136	0	136	0	100
144	12	124	-	13	15	124	0	124	0	100
145	12	122	59 % GC	13	15	122	0	122	0	100
146	13	122	-	13	15	122	0	122	0	100
147	13	116	Poly C (5)	13	15	116	0	116	0	100
148	13	133	-	13	15	133	0	133	0	100
149	13	117	SNV	13	15	117	0	117	0	100
150	13	124	Poly T (6)	13	15	124	0	124	0	100
151	13	123	Poly T (5); 26 % GC	13	15	123	0	123	0	100
152	13	115	Poly A (5)	13	15	115	0	115	0	100
153	13	125	-	13	15	125	0	125	0	100
154	13	121	-	13	15	121	0	121	0	100
155	13	123	-	13	15	123	0	123	0	100
156	13	114	-	13	15	114	0	114	0	100
157	13	119	-	13	15	119	0	119	0	100
158	14	122	58 % GC	13	15	122	0	122	0	100
159	16	122	-	13	15	122	0	122	0	100

Amplikon	Chromosom	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl der eindeutigen Proben	Gesamtzahl analysierter Proben <sup>2</sup>	Anzahl der möglichen Calls pro Probe <sup>3</sup>	Anzahl der „No Calls“ <sup>4</sup>	Anzahl der korrekten Calls pro Probe <sup>5</sup>	Anzahl der falschen Calls <sup>6</sup>	% korrekte Calls <sup>7</sup>
160	16	121	-	13	15	121	0	121	0	100
161	16	123	Poly C (5)	13	15	123	0	123	0	100
162	17	119	-	13	15	119	0	119	0	100
163	17	119	61 % GC	13	15	119	0	119	0	100
164	17	135	-	13	15	135	0	135	0	100
165	17	116	Poly C (6); 60 % GC; SNV	13	15	116	0	116	0	100
166	17	123	-	13	15	123	0	123	0	100
167	17	116	62 % GC	13	15	116	0	116	0	100
168	17	118	Poly C (5); 65 % GC	13	15	118	0	118	0	100
169	17	129	-	13	15	129	0	129	0	100
170	17	131	Poly G (6); 67 % GC; SNV	13	15	131	0	131	0	100
171	17	127	61 % GC	13	15	127	0	127	0	100
172	17	118	Poly C (5)	13	15	118	0	118	0	100
173	17	138	61 % GC	13	15	138	0	138	0	100
174	17	131	58 % GC	13	15	131	0	131	0	100
175	18	112	-	13	15	112	0	112	0	100

Amplikon	Chromosom	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl der eindeutigen Proben	Gesamtzahl analysierter Proben <sup>2</sup>	Anzahl der möglichen Calls pro Probe <sup>3</sup>	Anzahl der „No Calls“ <sup>4</sup>	Anzahl der korrekten Calls pro Probe <sup>5</sup>	Anzahl der falschen Calls <sup>6</sup>	% korrekte Calls <sup>7</sup>
176	18	124	-	13	15	124	0	124	0	100
177	18	134	Poly A (6)	13	15	134	0	134	0	100
178	18	129	-	13	15	129	0	129	0	100
179	18	133	-	13	15	133	0	133	0	100
180	18	118	-	13	15	118	0	118	0	100
181	18	114	60 % GC	13	15	114	0	114	0	100
182	18	118	-	13	15	118	0	118	0	100
183	19	122	Poly G (6); 66 % GC	13	15	122	0	122	0	100
184	19	139	64 % GC	13	15	139	0	139	0	100
185	19	131	67 % GC	13	15	131	0	131	0	100
186	19	141	59 % GC; Homologe Region auf einem anderen Chromosom	13	15	141	0	141	0	100
187	19	121	Poly C (5); 72 % GC; Homologe Region auf einem anderen Chromosom	13	15	121	0	121	0	100
188	19	138	58 % GC	13	15	138	0	138	0	100
189	19	123	64 % GC	13	15	123	0	123	0	100

Amplikon	Chromosom	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl der eindeutigen Proben	Gesamtzahl analysierter Proben <sup>2</sup>	Anzahl der möglichen Calls pro Probe <sup>3</sup>	Anzahl der „No Calls“ <sup>4</sup>	Anzahl der korrekten Calls pro Probe <sup>5</sup>	Anzahl der falschen Calls <sup>6</sup>	% korrekte Calls <sup>7</sup>
190	19	138	-	13	15	138	0	138	0	100
191	20	117	Poly T (5)	13	15	117	0	117	0	100
192	22	136	Poly A (7)	13	15	136	0	136	0	100
193	22	122	Poly A (5); Poly C (5)	13	15	122	0	122	0	100
194	22	122	62 % GC; SNV	13	15	122	0	122	0	100
195	22	119	66 % GC	13	15	119	0	119	0	100

<sup>1</sup> Das analysierte Fragment steht für die Größe der sequenzierten Genomregion in Basen, ausgenommen Target-spezifische Primer.

<sup>2</sup> Die Gesamtzahl der aufgelisteten Proben ist 15, da zwei der 13 analysierten eindeutigen Proben in zwei unabhängigen Replikaten ausgeführt wurden.

<sup>3</sup> Die Anzahl der möglichen Calls/Probe ist die Anzahl der Basen, die eine angemessene Qualität für einen System-Call hatten.

<sup>4</sup> Die Anzahl der „No Calls“ ist die Anzahl der Basen in einem Amplikon, die zu einem „No Call“ im Lauf führt.

<sup>5</sup> Die Anzahl der korrekten Calls pro Probe ist die Anzahl der Basen im Amplikon, für die ein Call durchgeführt wurde und die als Ergebnis eine Übereinstimmung mit der Referenzsequenz des Humangenoms 19 und der gut charakterisierten zusammengesetzten Referenz hatte.

<sup>6</sup> Die Anzahl der falschen Calls ist die Gesamtzahl der falschen Calls für die SNV oder für das Indel in diesem Amplikon; zusätzliche Details zu falschen Calls finden Sie unten in den Fußnoten.

<sup>7</sup> „% korrekte Calls“ entspricht der Rate der korrekten Calls für alle Basen im Amplikon, wobei der korrekte Call für die SNV oder für das Indel auf den Informationen für die gut charakterisierte zusammengesetzte Referenz basiert und der korrekte Call für die Basen im Rest der Amplikonsequenz auf dem Vergleich mit der Referenzsequenz des Humangenoms 19 basiert. Diese Spalte enthält möglicherweise mehr als ein erwartetes Ergebnis für ein bestimmtes Amplikon, wenn einige Proben ein Indel enthalten und andere nicht, z. B. Amplikon 9. Der Prozentsatz an korrekten Calls für die Proben mit falschem Ergebnis wird in der Tabelle dargestellt.

<sup>8</sup> Amplikon 9 hat einen Homopolymerlauf von 14 As gemäß der Referenzsequenz des Humangenoms 19. Allerdings haben die Informationen für die gut charakterisierte zusammengesetzte Referenz für sieben von 13 Proben 13 As in diesem Homopolymerlauf. In diesen sieben Proben repräsentiert diese eine Basenpaar-Deletion ein falsches Negativ in der Studie zur MiSeqDx-Sequenzierungsgenauigkeit.

<sup>9</sup> Amplikon 46 hat eine Ein-Basen-Insertion, die in der Datenbank mit gut charakterisierter Referenz in neun Proben vorkommt und in allen Analyseproben korrekt erkannt wird.

<sup>10</sup> Amplikon 95 hat einen Homopolymerlauf von 14 As gemäß der Referenzsequenz des Humangenoms 19. Allerdings haben die Informationen für die gut charakterisierte zusammengesetzte Referenz für 13 von 13 Proben 15 As in diesem Homopolymerlauf. In diesen 13 Proben ist diese eine Basenpaar-Insertion ein falsches Negativ in der Studie zur MiSeqDx-Sequenzierungsgenauigkeit.

Die folgende Tabelle enthält Daten aus Studie 1 mit positiver und negativer prozentualer Übereinstimmung, wobei die Variantenergebnisse für PPA-Berechnungen mit den Informationen für die gut charakterisierte zusammengesetzte Referenz verglichen werden. Da die Informationen zur zusammengesetzten Referenz nur Ergebnisse für die Einzelnukleotidvarianten und Insertionen/Deletionen liefern, werden Ergebnisse von Basen ohne Varianten für NPA-Berechnungen mit der Referenzsequenz des Humangenoms 19 verglichen. Bei allen Basen ohne Varianten gab es eine 100-prozentige Übereinstimmung mit der Referenzsequenz. Alle SNVs hatten eine 100-prozentige Übereinstimmung mit der Referenzsequenz. Verpasste Varianten waren entweder 1-Basen-Insertionen oder 1-Basen-Deletionen in den Homopolymerregionen.

**Tabelle 2** Übereinstimmung der Ergebnisse von Base-Calls der MiSeqDx-Plattform mit Referenzdaten für 13 gut charakterisierte Proben

Probe	Anzahl Amplikone	% Amplikon-Abdeckung <sup>1</sup>	Erwartete Varianten pro Probe <sup>2</sup>	Korrekte Varianten-Calls	Verpasste Varianten <sup>3</sup>	Korrekte Calls von Basen ohne Varianten	PPA <sup>4</sup> (%)	NPA <sup>5</sup> (%)
NA12877	195	100	19	17	2	24418	89,47	100
NA12878	195	100	19	17	2	24417	89,47	100
NA12879	195	100	20	19	1	24416	95,00	100
NA12880	195	100	20	18	2	24417	90,00	100
NA12881	195	100	22	20	2	24415	90,91	100
NA12882	195	100	16	15	1	24419	93,75	100
NA12883	195	100	24	23	1	24412	95,83	100
NA12884	195	100	21	20	1	24415	95,24	100
NA12885	195	100	19	17	2	24417	89,47	100
NA12886	195	100	22	20	2	24415	90,91	100
NA12887	195	100	19	18	1	24416	94,74	100
NA12888	195	100	24	23	1	24412	95,83	100
NA12893	195	100	20	18	2	24417	90,00	100

<sup>1</sup> % Amplikon-Abdeckung ist die Anzahl der Basen in den Amplikonen, die zuverlässig sequenziert wurden.

<sup>2</sup> Erwartete Varianten pro Probe enthalten sowohl SNVs als auch Indels.

<sup>3</sup> Zu den fehlenden Varianten beachten Sie bitte die erste Tabelle für Studie 1 und die Fußnoten 8–10.

<sup>4</sup> Die positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) =  $100 \times TP / (TP + FN)$ , wobei die Echt-Positiv-Werte (true positives, TP) die Anzahl der positiven Varianten-Calls an den genomischen Koordinaten sind, wo die Varianten gemäß der Referenzsequenz vorhanden und Mutanten-Allel-Calls konkordant mit der Referenzsequenz (Spalte „Korrekte Varianten-Calls“) sind, und die Falsch-Negativ-Werte (false negatives, FN) die Anzahl der negativen Varianten-Calls an den genomischen Koordinaten sind, wo die Varianten gemäß der Referenzsequenz vorhanden sind (Spalte „Verpasste Varianten“).

<sup>5</sup> Die negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) =  $100 \times TN / (FP + TN)$ , wobei die Falsch-Positiv-Werte (FP) die Anzahl der positiven Varianten-Calls an den genomischen Koordinaten sind, wo die Varianten gemäß der Referenzsequenz nicht vorhanden oder wenn Mutanten-Allel-Calls nicht konkordant mit der Referenzsequenz sind (kommt in der Tabelle nicht vor; in dieser Studie gab es keine falsch positiven Varianten-Calls), und Echt-Negativ-Werte (TN) die Anzahl der negativen Varianten-Calls an den genomischen Koordinaten sind, wo die Varianten gemäß dem Referenzstandard nicht vorhanden sind (Spalte „Korrekte Calls von Basen ohne Varianten“).

## Studie 2

Die Sequenzierungsergebnisse für das obige Amplikon-Panel wurden mit einem äußerst zuverlässigen Genotyp verglichen, der vom National Institute of Standards and Technology (NIST) (v.2.15<sup>1</sup>) für NA12878 festgelegt wurde. Von den 195 Amplikonen befanden sich 184 Amplikone innerhalb äußerst zuverlässiger Referenz-Calls in der NIST-Sequenz und wurden verglichen. Base-Calls ohne Varianten wurden mit der Referenzsequenz des Humangenoms 19 verglichen.

**Tabelle 3** Vergleich der Sequenzierungsergebnisse der MiSeqDx-Plattform für die Probe NA12878 mit der NIST-Datenbank

Probe	Anzahl Amplikone	% Amplikon-Abdeckung <sup>2</sup>	Erwartete Varianten	Korrekte Varianten-Calls	Verpasste Varianten	Korrekte Calls von Basen ohne Varianten	PPA <sup>3</sup> (%)	NPA <sup>4</sup> (%)
NA12878	184	100	17	16	1 <sup>5</sup>	23066	94,12	100

<sup>1</sup> Zook, JM et al. Integrating sequencing datasets to form highly confident SNP and indel genotype calls for a whole human genome. arXiv:1307.4661 [q-bio.GN].

<sup>2</sup> % Amplikon-Abdeckung ist die Anzahl der Basen in den Amplikonen, die zuverlässig sequenziert wurden.

<sup>3</sup> Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) =  $100 \times TP / (TP + FN)$ .

<sup>4</sup> Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) =  $100 \times TN / (FP + TN)$ .

<sup>5</sup> Die verpasste Variante ist die eine Basenpaar-Deletion in Amplikon 9 im Homopolymerlauf der 14 As, für die es keinen Call von MiSeqDx gibt, die in der NIST-Sequenz vorhanden ist. Beachten Sie, dass die NIST-Sequenz nicht die eine Basenpaar-Insertion im anderen Homopolymer von As enthält, die in der anderen, in Studie 1 oben verwendeten Referenzdatenbank vorhanden war.

## Studie 3

Es wurde eine zusätzliche Genauigkeitsstudie durchgeführt, um die Leistung kleiner Insertionen und Deletionen in einem repräsentativen Assay, dem Illumina MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose, zu bewerten. Dieser enthielt eine Teilmenge von klinisch signifikanten genetischen Variationen von *CFTR*, die mit der MiSeq Reporter Software unter Verwendung des Workflows der MiSeqDx-Plattform für die gezielte DNA-Sequenzierung analysiert wurden. Die abgefragten Insertionen und Deletionen wurden mit hoher Zuverlässigkeit an den Stellen gefunden, an denen sie erwartet wurden. Diese Proben wurden durch die bidirektionale Sanger-Sequenzierung als eine Referenzmethode charakterisiert, um die erwartete Sequenz zu etablieren.

**Tabelle 4** Zusammenfassung der Indel-Erkennung mit der MiSeqDx-Plattform

Amplikon	Insert-Größe	Amplikon-Genominhalt	Anz. der möglichen Calls/Probe	Anz. der Base-Calls/Probe	Anz. der „No Calls“	Anz. der korrekten Calls/Probe	Anzahl der falschen Calls	% korrekte Calls
1	129	1-Basen-Insertion	130	130	0	130	0	100
2	154	3-Basen-Deletion	151	151	0	151	0	100
3	167	2-Basen-Deletion	165	165	0	165	0	100
4	134	1-Basen-Deletion	133	133	0	133	0	100
5	132	1-Basen-Deletion	131	131	0	131	0	100
6	129	1-Basen-Deletion	128	128	0	128	0	100

Die bei diesen Studien zur Genauigkeit bereitgestellten Daten unterstützen den Anspruch, dass die MiSeqDx-Plattform Folgendes genau sequenzieren kann:

- GC-Inhalt  $\geq 19$  % (alle Basen in 135 von 135 sequenzierten Amplikonen mit 19 % GC-Inhalt und korrekten Calls)
- GC-Inhalt  $\leq 72$  % (alle Basen in 135 von 135 sequenzierten Amplikonen mit 72 % GC-Inhalt und korrekten Calls)
- PolyA-Längen  $\leq 7$  (PolyA-Wiederholung von sieben Nukleotiden mit korrekten Calls in 270 von 270 sequenzierten Amplikonen, die PolyA = 7 enthalten)
- PolyT-Längen  $\leq 8$  (PolyT-Wiederholung von acht Nukleotiden mit korrekten Calls in 270 von 270 sequenzierten Amplikonen, die PolyT = 8 enthalten)
- PolyG-Längen  $\leq 6$  (PolyG-Wiederholung von sechs Nukleotiden mit korrekten Calls in 405 von 405 sequenzierten Amplikonen, die PolyG = 6 enthalten)
- PolyC-Längen  $\leq 7$  (PolyC-Wiederholung von sieben Nukleotiden mit korrekten Calls in 135 von 135 sequenzierten Amplikonen, die PolyC = 7 enthalten)
- Längen von Dinukleotid-Wiederholungen  $\leq 5x$  (alle Basen in 135 von 135 sequenzierten Amplikonen mit  $5x$  Dinukleotid-Wiederholung und korrekten Calls)
- Längen von Trinukleotid-Wiederholungen  $\leq 4x$  (alle Basen in 810 von 810 sequenzierten Amplikonen mit  $4x$  Trinukleotid-Wiederholungen und korrekten Calls)
- 1-Basen-Insertionen und 3- oder weniger Basen-Deletionen
  - Zwei von drei getesteten 1-Basen-Insertionen hatten korrekte Calls. Für zwei 1-Basen-Insertionen in Nicht-Homopolymerregionen in 82 Amplikonen wurden korrekte Calls durchgeführt. Es gab keinen Call für eine 1-Basen-Insertion in einem Homopolymerlauf von 14 As auf Chromosom 2 in 135 Amplikonen.
  - Drei von vier 1-Basen-Deletionen hatten korrekte Calls. Alle korrekten Calls wurden in Nicht-Homopolymerregionen in vier Amplikonen durchgeführt. Es gab keinen Call für eine 1-Basen-Deletion in einem Homopolymerlauf von 14 As auf Chromosom 9 in 63 Amplikonen.
  - Eine 2-Basen-Deletion hatte in einer Probe korrekte Calls.
  - 3-Basen-Deletionen hatten in 21 Proben korrekte Calls.

## Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der MiSeqDx-Plattform wurde unter Verwendung von zwei repräsentativen Assays ermittelt.

### Studie 1

Ein zum Abfragen zahlreicher Gene entwickelter repräsentativer Assay, der 24.434 Basen über 19 unterschiedliche Chromosomen hinweg abdeckt und potenziell klinisch relevante Exons enthält. Bei der Studie wurden 13 Proben über neun Läufe mit drei verschiedenen MiSeqDx-Geräten und drei verschiedenen Bedienern untersucht (Tabelle 5). Es wurden eine einzelne Charge der Bibliotheksvorbereitungsreagenzien und zwei Chargen der Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien verwendet. Die 13 Proben stammten von zwei Elternteilen und 11 Kindern, die regelmäßig von mehreren Labors und mit verschiedenen Sequenzierungsmethoden sequenziert wurden. Zwei Proben wurden doppelt ausgeführt, sodass jeder Lauf Ergebnisse für 15 Proben generierte.

Für die Auswertung der Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge wurden 94 Proben und zwei Nicht-Matrizen-Kontrollproben über drei Chargen hinweg getestet. Jede Charge wurde in zwei Läufe mit 48 Proben aufgeteilt, um alle Reagenzien und möglichen Index-Primer-Kombinationen zu testen. Alle Sequenzierungsläufe wurden von einem einzigen Bediener auf einem einzigen MiSeqDx-Gerät ausgeführt, um mögliche Varianzen aufgrund des Bedieners oder Geräts zu vermeiden (Tabelle 6).

Korrekte Calls wurden für Einzelnukleotidvarianten (SNVs) ermittelt, indem die Daten der Studie mit gut charakterisierten Referenzinformationen verglichen wurden. Es gab keine fehlgeschlagenen Läufe oder erneuten Läufe für die Reproduzierbarkeitsstudie. Die folgenden Tabellen enthalten die Ergebnisse der Studien zur Bewertung der Reproduzierbarkeit des Systems.



Tabelle 5 Studie 1 – Reproduzierbarkeitsergebnisse von Gerät zu Gerät für die MiSeqDx-Plattform (Amplikon-Ebene)

Amplikon	Chr.	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl ausgeführter Proben <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>
1	1	132	Poly C (5); 63 % GC	135	0	0	100	23 <sup>6</sup>	0	99,61 <sup>7</sup>	39 <sup>6</sup>	0	99,34 <sup>7</sup>
2	1	128	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	2	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	2	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
5	2	127	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
6	2	135	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
7	2	122	Poly T (5); Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
8	2	110	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
9	2	131	Poly A (14)	135	0	27 <sup>8</sup>	99,54	0	27 <sup>8</sup>	99,54	0	27 <sup>8</sup>	99,54
10	2	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
11	2	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
12	2	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
13	2	129	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
14	3	131	Poly A (5); Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
15	3	130	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Chr.	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl ausgeführter Proben <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>
16	3	130	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
17	3	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
18	3	136	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
19	3	131	Poly T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
20	3	123	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
21	3	117	Poly A (6); Poly T (5); Homologe Region auf einem anderen Chromosom	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
22	3	119	Homologe Region auf einem anderen Chromosom	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
23	3	120	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
24	3	129	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
25	4	133	Poly C (7); 66 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Chr.	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl ausgeführter Proben <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>
26	4	135	Poly C (5); 69 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
27	4	123	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
28	4	134	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
29	4	132	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
30	4	121	Poly A (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
31	4	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
32	4	134	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
33	4	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
34	4	122	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
35	4	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
36	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
37	4	128	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
38	4	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
39	4	129	Poly A (5); Poly T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
40	4	133	Poly T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Chr.	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl ausgeführter Proben <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>
41	4	112	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
42	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
43	4	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
44	4	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
45	4	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
46	4	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
47	4	117	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
48	4	128	Poly A (7)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
49	4	123	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
50	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
51	4	112	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
52	4	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
53	4	126	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
54	4	132	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
55	5	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
56	5	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
57	5	120	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
58	5	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Chr.	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl ausgeführter Proben <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>
59	5	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
60	5	112	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
61	5	120	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
62	5	120	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
63	5	115	CT(5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
64	5	112	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
65	5	135	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
66	5	131	63 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
67	5	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
68	5	132	Poly A (6); Poly T (8)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
69	7	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
70	7	120	60 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
71	7	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
72	7	126	Poly A (5); 59 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
73	7	134	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
74	7	122	Poly C (5); 63 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Chr.	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl ausgeführter Proben <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>
75	7	127	59 % GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
76	7	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
77	7	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
78	7	133	Poly A (5); Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
79	7	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
80	7	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
81	7	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
82	7	136	67 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
83	7	131	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
84	7	119	Poly G (6); 61 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
85	7	122	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
86	7	123	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
87	8	127	60 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
88	8	129	57 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
89	9	130	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
90	9	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Chr.	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl ausgeführter Proben <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>
91	9	119	Homologe Region auf einem anderen Chromosom	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
92	9	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
93	9	117	Homologe Region auf einem anderen Chromosom	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
94	9	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
95	9	129	Poly A (14)	135	0	45 <sup>9</sup>	99,22	0	45 <sup>9</sup>	99,22	0	45 <sup>9</sup>	99,22
96	9	114	Homologe Region auf einem anderen Chromosom; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
97	9	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
98	9	127	Poly A (5); Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
99	9	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
100	9	138	64 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Chr.	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl ausgeführter Proben <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>
101	9	139	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
102	9	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
103	9	133	Poly A (5); 57 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
104	9	138	57 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
105	9	136	Poly C (5); 67 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
106	9	118	70 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
107	10	128	62 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
108	10	120	60 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
109	10	139	58 % GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
110	10	118	57 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
111	10	123	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
112	10	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
113	10	129	26 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
114	10	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100



Amplikon	Chr.	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl ausgeführter Proben <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>
115	10	124	Poly T (5); Homologe Region auf einem anderen Chromosom	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
116	10	135	CA(4)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
117	10	135	Poly A (6); Homologe Region auf einem anderen Chromosom	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
118	10	119	Poly C (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
119	10	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
120	10	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
121	10	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
122	10	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
123	10	129	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
124	11	117	Poly T (10)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
125	11	117	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
126	11	113	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Chr.	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl ausgeführter Proben <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>
127	11	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
128	11	121	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
129	11	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
130	11	127	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
131	11	136	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
132	11	132	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
133	11	115	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
134	11	117	Poly T (8); 19 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
135	11	134	Poly A (5); Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
136	11	131	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
137	11	133	SNV; 26 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
138	11	137	Poly T (8); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
139	11	131	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
140	12	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
141	12	128	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Chr.	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl ausgeführter Proben <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>
142	12	133	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
143	12	136	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
144	12	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
145	12	122	59 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
146	13	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
147	13	116	Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
148	13	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
149	13	117	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
150	13	124	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
151	13	123	Poly T (5); 26 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
152	13	115	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
153	13	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
154	13	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
155	13	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
156	13	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
157	13	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
158	14	122	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Chr.	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl ausgeführter Proben <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>
159	16	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
160	16	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
161	16	123	Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
162	17	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
163	17	119	61 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
164	17	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
165	17	116	Poly C (6); 60 % GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
166	17	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
167	17	116	62 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
168	17	118	Poly C (5); 65 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
169	17	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
170	17	131	Poly G (6); 67 % GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
171	17	127	61 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
172	17	118	Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
173	17	138	61 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Chr.	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl ausgeführter Proben <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>
174	17	131	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
175	18	112	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
176	18	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
177	18	134	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
178	18	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
179	18	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
180	18	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
181	18	114	60 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
182	18	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
183	19	122	Poly G (6); 66 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
184	19	139	64 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
185	19	131	67 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
186	19	141	59 % GC; Homologe Region auf einem anderen Chromosom	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplikon	Chr.	Größe des analysierten Fragments <sup>1</sup>	Amplikon-Genominhalt	Anzahl ausgeführter Proben <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>	Gesamtzahl der „No Calls“ <sup>3</sup>	Gesamtzahl der falschen Calls <sup>4</sup>	% korrekte Calls <sup>5</sup>
187	19	121	Poly C (5); 72 % GC; Homologe Region auf einem anderen Chromosom	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
188	19	138	58 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
189	19	123	64 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
190	19	138	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
191	20	117	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
192	22	136	Poly A (7)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
193	22	122	Poly A (5); Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
194	22	122	62 % GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
195	22	119	66 % GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

<sup>1</sup> Analysiertes Fragment bedeutet die Größe der sequenzierten Genomregion in Basen, ausgenommen Target-spezifische Primer.

<sup>2</sup> Die Anzahl der Proben wird aus neun Läufen von 15 Proben berechnet (11 Proben werden einmal und zwei Proben zweimal ausgeführt).

<sup>3</sup> Die Gesamtzahl der „No Calls“ ist die kombinierte Anzahl der „No Calls“ für alle 45 Läufe zum Analysieren der spezifischen Amplikone unter Verwendung eines bestimmten MiSeqDx-Geräts.

<sup>4</sup> Die Gesamtzahl der falschen Calls ist die kombinierte Anzahl der falschen Calls für alle 45 Läufe zum Analysieren der spezifischen Amplikone unter Verwendung eines bestimmten MiSeqDx-Geräts.

<sup>5</sup> „% korrekte Calls“ entspricht der Rate der korrekten Calls für alle Basen im Amplikon, wobei der korrekte Call für die SNV oder für das Indel auf der gut charakterisierten Referenzdatenbank basiert und der korrekte Call für die Basen im Rest der Amplikonsequenz auf dem Vergleich mit der Referenzsequenz des Humangenoms 19 basiert. Diese Spalte enthält möglicherweise mehr als ein erwartetes Ergebnis für ein bestimmtes Amplikon, wenn erwartet wird, dass einige Proben ein Indel enthalten und andere nicht, z. B. Amplikon 9.

- <sup>6</sup> Amplikon 1 wies eine Reihe von Basen auf, für die kein Genotypaufruf möglich war: 12 Basen in 1/9 Läufen in NA12881; eine Base in 2/9 Läufen und drei Basen in 1/9 Läufen in NA12886; 20 Basen in 1/9 Läufen und 26 Basen in 1/9 Läufen in NA12888. Dies liegt an der niedrigen Abdeckung bei No-Call-Basen in diesen Läufen, wobei die durchschnittliche Sequenzierungstiefe 33,2 betrug, bei einem Minimum von 21 und einem Maximum von 52.
- <sup>7</sup> Wenn in der Berechnung die No Calls nicht berücksichtigt werden, beträgt die korrekte Call-Rate 100 %.
- <sup>8</sup> Amplikon 9 hat einen Homopolymerlauf von 14 As gemäß der Referenzsequenz des Humangenoms 19. Allerdings haben die gut charakterisierten Referenzinformationen für sieben von 13 Proben 13 As in diesem Homopolymerlauf. In diesen sieben Proben ist diese eine Basenpaar-Deletion ein falsches Negativ und wird in allen neun Läufen als Falsch-Negativ-Reproduzierbarkeit aufgerufen.
- <sup>9</sup> Amplikon 95 hat einen Homopolymerlauf von 14 As gemäß der Referenzsequenz des Humangenoms 19. Allerdings haben die gut charakterisierten Referenzsequenzen für 13 von 13 Proben 15 As in diesem Homopolymerlauf. In diesen 13 Proben wird diese eine Basenpaar-Insertion 100 % reproduzierbar nicht aufgerufen (d. h., es handelt sich um ein falsches Negativ).

Die Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsstudie 1 für jede Probe werden für alle neun Läufe zusammengefasst in einer Spalte aufgeführt. Die angezeigten Ergebnisse beziehen sich nur auf die Einzelnukleotidvarianten und die Insertionen/Deletionen im Vergleich mit der Sequenz in der Referenzdatenbank für drei Läufe auf drei Geräten. Diese Analyse zeigt, dass die Ergebnisse für die Varianten in diesen Proben in neun Läufen reproduziert werden konnten.

**Tabelle 6** Zusammenfassung der Reproduzierbarkeitsergebnisse der MiSeqDx-Plattform für 13 gut charakterisierte Proben

DNA-Nr.	DNA-Proben-ID	Anzahl Läufe pro Probe	Anzahl SNVs	Einzelnukleotidvarianten (SNVs)			Anzahl Indels	Insertionen\Deletionen (Indels)		
				Anzahl korrekter Calls	Anzahl falsch positiver Calls <sup>1</sup>	Anzahl falsch negativer Calls <sup>2</sup>		Anzahl korrekter Calls	Anzahl falsch positiver Calls <sup>1</sup>	Anzahl falsch negativer Calls <sup>2</sup>
1	NA12877 <sup>3</sup>	18	16	16	0	0	3	1	0	2
2	NA12878 <sup>3</sup>	18	17	17	0	0	2	0	0	2
3	NA12879	9	18	18	0	0	2	1	0	1
4	NA12880	9	17	17	0	0	3	1	0	2
5	NA12881	9	19	19	0	0	3	1	0	2
6	NA12882	9	15	15	0	0	1	0	0	1
7	NA12883	9	22	22	0	0	2	1	0	1
8	NA12884	9	19	19	0	0	2	1	0	1
9	NA12885	9	17	17	0	0	2	0	0	2
10	NA12886	9	19	19	0	0	3	1	0	2
11	NA12887	9	18	18	0	0	1	0	0	1
12	NA12888	9	22	22	0	0	2	1	0	1
13	NA12893	9	17	17	0	0	3	1	0	2

<sup>1</sup> Falsch positiver Call = Varianten-Call im MiSeqDx-Sequenzierungslauf, aber nicht in der Referenzdatenbank.

<sup>2</sup> Falsch negativer Call = Varianten-Call in der Referenzdatenbank, aber nicht im MiSeqDx-Sequenzierungslauf.

<sup>3</sup> Die Proben NA12877 und NA12878 wurden doppelt ausgeführt. Die Replikatproben ergaben identische Ergebnisse.



## Studie 2

Eine Studie zur Reproduzierbarkeit von Standort zu Standort, die mit einem repräsentativen Assay, dem Illumina MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose, durchgeführt wurde, enthielt eine Teilmenge von klinisch signifikanten genetischen Variationen von *CFTR*, die mit der MiSeq Reporter Software unter Verwendung des Workflows der MiSeqDx-Plattform für die gezielte DNA-Sequenzierung analysiert wurden. Für die Blindstudie wurden drei Prüfstandorte mit je zwei Bedienern pro Standort verwendet. Zwei gut charakterisierte Panels mit jeweils 46 Proben wurden an jedem Standort von beiden Bedienern getestet. Daraus ergaben sich 810 Calls pro Standort. Die Panels enthielten eine Mischung aus genomischer DNA aus Zelllinien mit bekannten Varianten im *CFTR*-Gen sowie einige leukozytenbereinigte Blutproben, die mit Zelllinien bekannter Varianten im *CFTR*-Gen versetzt wurden. Die Blutproben wurden bereitgestellt, um die Inkorporation der Extraktionsschritte zum Vorbereiten der gDNA zu ermöglichen, die als primäre Zugabe für den Assay-Workflow dient. Die Proben-First-Pass-Rate, definiert als die Anzahl der Proben, die beim ersten Versuch den QC-Kennzahlen entsprechen, betrug 99,88 %. Alle Testergebnisse basieren auf anfänglichen Tests.

**Tabelle 7** Zusammenfassung der Ergebnisse der Studie zur Reproduzierbarkeit mit einem repräsentativen MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose

Panel	Proben-Nr.	Proben-Genotyp	Varianten	Calls insgesamt pro Standort	Positiv übereinstimmende Calls (Varianten)			Negativ übereinstimmende Calls (Wildtyp)			Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamtübereinstimmung (%)
					Standort 1	Standort 2	Standort 3	Standort 1	Standort 2	Standort 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4 <sup>1</sup>	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 <sup>1</sup>	100	100	100
A	5 <sup>2</sup>	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Proben-Nr.	Proben-Genotyp	Varianten	Calls insgesamt pro Standort	Positiv übereinstimmende Calls (Varianten)			Negativ übereinstimmende Calls (Wildtyp)			Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamtübereinstimmung (%)
					Standort 1	Standort 2	Standort 3	Standort 1	Standort 2	Standort 3					
A	9 <sup>3</sup>	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92
A	10 <sup>3</sup>	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C nicht vorhanden	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

Panel	Proben-Nr.	Proben-Genotyp	Varianten	Calls insgesamt pro Standort	Positiv übereinstimmende Calls (Varianten)			Negativ übereinstimmende Calls (Wildtyp)			Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamtübereinstimmung (%)
					Standort 1	Standort 2	Standort 3	Standort 1	Standort 2	Standort 3					
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	n. z.	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	n. z.	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Proben-Nr.	Proben-Genotyp	Varianten	Calls insgesamt pro Standort	Positiv übereinstimmende Calls (Varianten)			Negativ übereinstimmende Calls (Wildtyp)			Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamtübereinstimmung (%)
					Standort 1	Standort 2	Standort 3	Standort 1	Standort 2	Standort 3					
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	n. z.	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	n. z.	100	100

Panel	Proben-Nr.	Proben-Genotyp	Varianten	Calls insgesamt pro Standort	Positiv übereinstimmende Calls (Varianten)			Negativ übereinstimmende Calls (Wildtyp)			Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamtübereinstimmung (%)
					Standort 1	Standort 2	Standort 3	Standort 1	Standort 2	Standort 3					
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	n. z.	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	n. z.	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	n. z.	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	n. z.	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	n. z.	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Proben-Nr.	Proben-Genotyp	Varianten	Calls insgesamt pro Standort	Positiv übereinstimmende Calls (Varianten)			Negativ übereinstimmende Calls (Wildtyp)			Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamtübereinstimmung (%)
					Standort 1	Standort 2	Standort 3	Standort 1	Standort 2	Standort 3					
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	n. z.	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 <sup>4</sup>	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75 <sup>2</sup>	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	n. z.	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Proben-Nr.	Proben-Genotyp	Varianten	Calls insgesamt pro Standort	Positiv übereinstimmende Calls (Varianten)			Negativ übereinstimmende Calls (Wildtyp)			Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamtübereinstimmung (%)
					Standort 1	Standort 2	Standort 3	Standort 1	Standort 2	Standort 3					
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 <sup>4</sup>	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	n. z.	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
Summe				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

<sup>1</sup> Die Position des Wildtyps, die der N1303K-Variante für ein Replikat entspricht, führte aufgrund unzureichender Abdeckung zu einem „No Call“.

<sup>2</sup> Ein Replikat der Proben 5 und 75 hatte eine Call-Rate von 0 %. Die weitere Untersuchung deutet darauf hin, dass vor der Bibliotheksvorbereitung möglicherweise keine Proben zur Probenplatte hinzugefügt wurden, da die in den Röhrchen verbleibenden Probenvolumina konsistent waren und nichts von der Füllmenge entfernt wurde.

<sup>3</sup> Es gibt Hinweise darauf, dass die Proben 9 und 10 vor der Bibliotheksvorbereitung wahrscheinlich vom Bediener vertauscht wurden.

<sup>4</sup> Die Position des Wildtyps, die der M1V-Variante für ein Replikat entspricht, führte aufgrund unzureichender Abdeckung zu einem „No Call“.

## DNA-Extraktion

Es wurden drei unterschiedliche Extraktionsmethoden – Extraktion des magnetischen Beads, Alkoholpräzipitation und Kieselgelsäule-Isolation – unter Verwendung von K<sub>2</sub>EDTA antikoaguliertem Vollblut ausgewertet. In dieser Studie wurden 14 eindeutige Blutproben verwendet, die für zahlreiche Genotypen aus einem repräsentativen Gen stehen. Die drei DNA-Extraktionsmethoden wurden von zwei verschiedenen Bedienern unabhängig getestet, von denen jeder drei Läufe pro Extraktionsmethode durchgeführt hat. Jede Extraktion wurde vom jeweiligen Bediener an unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Die DNA-Konzentration und das A260/A280-Verhältnis der extrahierten gDNA-Proben wurden mithilfe der Spektrofotometrie ermittelt. Die Gesamtzahl der Proben für jede Extraktionsmethode der Studie ist 168 (14 Proben x 2 Bediener/Extraktionsmethode x 3 Läufe/Bediener x 2 Replikate/extrahierte gDNA-Probe).

Extraktionsmethode	Anzahl der getesteten Proben	Call-Rate	Genauigkeit <sup>1</sup>	Proben-First-Pass-Rate <sup>2</sup>
Alkoholpräzipitation	168	100 %	100 %	100 %
Kieselgelsäule-Isolation	168	100 %	100 %	100 %
Extraktion des magnetischen Beads	168	100 %	100 %	100 %

<sup>1</sup> Genauigkeit – Die prozentuale Übereinstimmung mit einer Referenztestmethode (bidirektionale Sequenzierung nach Sanger), die für Basenpositionen berechnet wurde, die einen Base-Call empfangen.

<sup>2</sup> Proben-First-Pass-Rate – Die Anzahl der Proben, die die angegebene Call-Rate bei der ersten Verarbeitung erfüllen (d. h. ohne das Erfordernis eines erneuten Laufs oder einer zusätzlichen Verarbeitung), in Prozent der Gesamtzahl der Proben, die während eines einzelnen MiSeqDx-Sequenzierungsversuchs ausgeführt wurden.

## DNA-Zugabe

Der DNA-Zugabebereich für die MiSeqDx-Plattform wurde untersucht, indem eine Studie zur seriellen Verdünnung mit 14 repräsentativen DNA-Proben durchgeführt wurde, die 16 eindeutige, einzelne Genvarianten enthielten. Jede Probe wurde bei neun DNA-Zugabestufen von 1.250 ng bis 1 ng (1.250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng und 1 ng) doppelt getestet. Zur Ermittlung der Genauigkeit wurden Genotyp-Proben mit bidirektionalen Sequenzierungsdaten nach Sanger verglichen. 1.250 ng und 25 ng wurden als Ober- und Untergrenze für die DNA-Zugabe identifiziert, da sie eine Proben-First-Pass-Rate von  $\geq 95\%$  ohne falsche Calls (100 % Genauigkeit und Call-Rate) hatten.

Die DNA-Zugaben von 1.250 ng, 250 ng und 100 ng wurden mit vier repräsentativen DNA-Proben und 20 Replikaten pro DNA-Zugabestufe für jede Probe ( $n = 4 \cdot 20 = 80$  Proben) weiter getestet, während die Untergrenze von 25 ng mit 14 Proben und 20 Replikaten für jede Probe ( $n = 14 \cdot 20 = 280$  Proben) getestet wurde. Die Genauigkeit und die Proben-First-Pass-Rate betragen bei allen DNA-Zugabestufen 100 % und bei allen Proben-Call-Raten über 99 %.

## Störende Substanzen

Um die Auswirkungen störender Substanzen auf die MiSeqDx-Plattform zu überprüfen, wurde ein repräsentativer Assay, der zum Abfragen eines einzelnen Gens mit 11.529 Basen entworfen wurde, mit und ohne potenzielle Störsubstanzen untersucht. In dieser Studie wurden acht Vollblutproben, die acht eindeutige Genotypen repräsentieren, verwendet. Vier körpereigene störende Substanzen (Bilirubin, Cholesterin, Hämoglobin und Triglycerid) wurden getestet, indem die Blutproben vor der DNA-Extraktion mit diesen versetzt wurden. Um die Störungen aufgrund der Blutentnahme (geringe Menge) zu untersuchen, wurden die Blutproben in zwei Konzentrationen mit EDTA versetzt. Die Konzentrationsgrenzen für jede Substanz sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Um außerdem die Störungen aufgrund der Probenvorbereitung zu untersuchen, wurden acht gereinigten genomischen DNA-Proben 15 % Waschpuffer hinzugegeben. Eine Call-Rate von 100 % wurde bei allen Proben erreicht, bei denen zusätzlich zur 100%-Reproduzierbarkeit in den Genotypaufrufen zwischen Proben Tests mit und ohne störende Substanzen durchgeführt wurden.



Testsubstanz	Gesamtzahl der Replikate	Getestete Konzentration im Blut (Obergrenze)	Getestete Konzentration im Blut (Untergrenze)	Call-Rate
Bilirubin	16	684 µmol/l	137 µmol/l	100 %
Cholesterin	16	13 mmol/l	2,6 mmol/l	100 %
Hämoglobin	16	2 g/l	0,4 g/l	100 %
Triglycerid	16	37 mmol/l	7,4 mmol/l	100 %
EDTA	16	7 mg/ml	2,8 mg/ml	100 %

## Probenindizierung

Proben-Index-Primer dienen im Kit dazu, jeder Proben-DNA einen eindeutigen Barcode zuzuweisen, wodurch es möglich ist, mehrere Proben in einem einzigen Sequenzierungslauf zusammenzufassen.

Es wurden insgesamt 96 Probenindizes mit einem repräsentativen Assay, der zum Abfragen eines einzelnen Gens mit 11.529 Basen ausgelegt wurde, unter Verwendung von acht eindeutigen DNA-Proben getestet, um die Fähigkeit des Assays zu überprüfen, dauerhaft Genotypaufrufe für eine bestimmte Probe über verschiedene Index-Primer-Kombinationen hinweg vornehmen zu können. Jede Probe wurde mit 12 unterschiedlichen Kombinationen von Index-Primern getestet. Es wurden 48 Indexkombinationen in einem Sequenzierungslauf getestet. Die Probenergebnisse wurden für alle Positionen/Varianten mit den bidirektionalen Sequenzierungsdaten nach Sanger verglichen. Die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit betrug für alle Proben/Index-Primer-Kombinationen 100 %.

## Patente und Marken

Dieses Dokument und dessen Inhalt sind Eigentum von Illumina, Inc. und deren Partner-/Tochterunternehmen („Illumina“) und ausschließlich für den bestimmungsgemäßen Gebrauch durch den Kunden in Verbindung mit dem Gebrauch des hier beschriebenen Produkts (der hier beschriebenen Produkte) und für keinen anderen Bestimmungszweck ausgelegt. Dieses Handbuch und dessen Inhalt dürfen ohne schriftliches Einverständnis von Illumina nicht verwendet und zu keinem anderen Zweck verteilt bzw. anderweitig übermittelt, offengelegt oder auf irgendeine Weise reproduziert werden. Illumina überträgt mit diesem Dokument keine Lizenzen unter seinem Patent, Markenzeichen, Urheberrecht oder bürgerlichen Recht bzw. ähnlichen Rechten an Drittparteien.

Die Anweisungen in diesem Dokument müssen von qualifiziertem und entsprechend ausgebildetem Personal genau befolgt werden, damit die in diesem Dokument beschriebene Anwendung der Produkte sicher und ordnungsgemäß erfolgt. Vor der Verwendung dieser Produkte muss der Inhalt dieses Dokuments vollständig gelesen und verstanden worden sein.

FALLS NICHT ALLE HIERIN AUFGEFÜHRTEN ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE ANDERWEITIGER SACHSCHADEN EINTRETEN.

ILLUMINA ÜBERNIMMT KEINERLEI HAFTUNG FÜR SCHÄDEN, DIE AUS DER UNSACHGEMÄSSEN VERWENDUNG DER HIERIN BESCHRIEBENEN PRODUKTE (EINSCHLIESSLICH TEILEN HIERVON ODER DER SOFTWARE) ENTSTEHEN.

© 2020 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Illumina, MiSeq, MiSeqDx, die orange Farbe und das Streaming-Basen-Design sind Marken von Illumina, Inc. und/oder ihren Tochtergesellschaften in den USA und/oder anderen Ländern. Alle anderen Namen, Logos und Marken sind Eigentum der jeweiligen Eigentümer.

## Kontaktinformationen



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, Kalifornien 92122, USA  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (außerhalb von  
Nordamerika)  
techsupport@illumina.com  
[www.illumina.com](http://www.illumina.com)



Illumina Netherlands B. V.  
Freddy van Riemsdijkweg 15  
5657 EE Eindhoven  
Niederlande

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

## Produktkennzeichnungen

Die vollständige Referenz der Symbole, die auf der Produktverpackung und -beschriftung verwendet werden, steht auf der Website im PDF-Format zum Herunterladen zur Verfügung. Gehen Sie zu „support.illumina.com“, wählen Sie ein Produkt und wählen Sie anschließend „Documentation & Literature“ (Dokumentation und Literatur).