

53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1.005	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	1.470	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	n. z.	0,49	1.440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1.242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), Indel	0,68	1.455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), Indel	0,47	1.170	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	0	0	1.365	0
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1.185	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	1.350	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	1.425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), Indel	0,42	1.290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	n. z.	0,49	1.200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	n. z.	0,51	1.215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	n. z.	0,45	1.440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1.050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	n. z.	0,65	1.500	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	930	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	n. z.	0,59	1.530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1.095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	n. z.	0,42	1.275	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	1.365	0	0	100

75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	1.275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), Indel	0,34	1.275	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	1.275	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), Indel	0,52	1.260	0	14	98,9
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	1.395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	n. z.	0,49	1.215	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1.065	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	1.425	0	0	100
83	12	24167504	24167576	73	73	n. z.	0,52	1.095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), Indel	0,22	1.305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	1.335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1.155	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	1.005	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	n. z.	0,25	1.245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), Indel	0,19	1.038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1.215	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	1.365	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	975	0	60	94,2
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	1.410	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	1.440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1.020	0	0	100

96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), Indel	0,68	1.395	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	1.425	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1.065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	n. z.	0,36	1.365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1.050	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	n. z.	0,27	945	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	1.425	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	1.305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	1.560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), Indel	0,37	1.362	0	3	99,8
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	1.335	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), Indel	0,67	1.303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	1.365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	1.395	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	1.335	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), Indel (x2)	0,29	1.215	0	78	94,0
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	1.365	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT (4), AT(4), Indel	0,26	1.365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1.175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	1.289	0	1	99,9
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	1.260	0	0	100

117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1.005	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	n. z.	0,37	1.365	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1.035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), Indel	0,37	1.121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), Indel	0,47	1.215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), Indel	0,45	1.275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	n. z.	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	n. z.	0,59	1.478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	n. z.	0,68	1.110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	n. z.	0,64	1.050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	n. z.	0,61	1.410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1.230	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1.140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), Indel	0,46	1.050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	1.515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1.005	0	6	99,4
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	1.320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	1.305	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	990	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	1.470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), Indel	0,39	1.305	0	0	100

138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), Indel	0,32	1.029	0	7	99,3
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	1.350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	1.500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	n. z.	0,68	1.455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	1.455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	n. z.	0,6	1.485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	1.380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1.035	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1.035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	n. z.	0,52	1.065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	n. z.	0,55	0	0	0	n. z.
149	Y	2655519	2655609	91	0	n. z.	0,48	0	0	0	n. z.
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	n. z.

Tabelle 12 enthält eine Liste der Varianten, die das Ergebnis „No Call“ hatten. In der Tabelle sind auch die entsprechenden Filter aufgeführt, die zu den „No Call“-Ergebnissen führten.

Tabelle 12 Zusammenfassung der Varianten mit „No Calls“

Amplikon-Nr.	Chr.-Pos.	Variante	Entsprechender Amplikon-Inhalt	Filter	Verpasste Varianten	Erwartete Varianten
28	5:1882129	T > G	78 % GC	LowDP ¹		
52	8:24811064	AG > A	PolyG (7), CTC(4), 61 % GC	R3 x 6 ²	15	15
60	10:11784633	C > T	PolyGC (3), 87 % GC	LowDP	13	13
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42 % GC	R3 x 6	9	9
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29 % GC	R3 x 6	13	13

¹ LowDP: Niedrige Abdeckung. Eine Variante wird gefiltert, wenn die Tiefe in mindestens einem der Pools an dieser Position unter 900 liegt.

² R3 x 6: Wiederholungsfiler. Eine Variante wird gefiltert, wenn die gesamte oder ein Teil der Variante im Referenzgenom angrenzend an die Variantenposition wiederholt vorkommt. Es müssen mindestens sechs Wiederholungen in der Referenz vorhanden sein und es werden nur Wiederholungen mit Längen von bis zu 3 bp berücksichtigt.

Die Sequenzierungsergebnisse der Probe wurden mit einem äußerst zuverlässigen Genotyp für NA12878 verglichen, der vom National Institute of Standards and Technology (NIST) (v.2.19) festgelegt wurde. Von den 150 Amplikons befanden sich 92 Amplikons vollständig innerhalb der äußerst zuverlässigen genomischen Regionen, 41 Amplikons wiesen eine Teilüberlappung und 17 Amplikons keine Überlappung in der NIST-Sequenz auf. Daraus ergaben sich 10.000 Koordinaten pro Replikat für den Vergleich. Base-Calls ohne Varianten wurden mit der Referenzsequenz des Humangenoms hg19 verglichen. Die Genauigkeitsergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13 Übereinstimmung der Base-Call-Ergebnisse des MiSeqDx-Geräts mit der NIST-Referenz für Probe GM12878

Probe	Anzahl Amplikons	Mittlere Call-Rate	Gesamtzahl TP-Varianten-Calls	Gesamtzahl FN-Varianten-Calls	Gesamtzahl TN-Calls	Gesamtzahl FP-Calls	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19.231	0	100	100	100

Die fünf unverdünnten Proben wurden auf das Calling kleiner Insertionen und Deletionen (Indels) hin weiter analysiert (Tabelle 14). In einigen Fällen kam das Indel in zwei oder mehreren Proben häufig vor, wie in der Spalte „Gesamtzahl der Probenreplikate mit Indel“ dargestellt. Die Ergebnisse beider Replikate der fünf Proben sind in Tabelle 14 aufgeführt. Es gab insgesamt 71 Indels mit 1–24 bp großen Insertionen und 1–25 bp großen Deletionen. 68 Indels wurden jeweils mit einer positiven prozentualen Übereinstimmung von 1 erkannt. Drei Insertionen und Deletionen wiesen keine korrekten Calls auf, da jede Variante aufgrund des R3 x 6-Filters zu einem „No Call“ führte. Daher konnte die PPA (Positive Percent Agreement, positive prozentuale Übereinstimmung), die „No Calls“ ausschließt, nicht berechnet werden. Die drei Varianten waren folgende: eine 1-bp-Deletion (chr8 24811064 AG>A), eine 2-bp-Deletion (chr10 55892600 TAC>T) und eine 1-bp-Insertion (chr17 39589692 C>CA).

Tabelle 14 Zusammenfassung der Indel-Erkennung mit dem MiSeqDx-Gerät

Amplikon	Chromosom	Position	Größe des analysierten Fragments	Amplikon-Indel-Typ und -Länge	Indel	Gesamtzahl der Probenreplikate mit Indel	Anz. der „No Calls“	Gesamtzahl falscher Indel-Calls	Gesamtzahl korrekter Indel-Calls	PPA
1	1	36450544	93	25-bp-Deletion	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	3-bp-Deletion	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	23-bp-Insertion	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	17-bp-Deletion	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	5-bp-Insertion	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	3-bp-Insertion	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	7-bp-Insertion	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	6-bp-Deletion	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	5-bp-Insertion	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	12-bp-Insertion	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	2-bp-Insertion	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	23-bp-Deletion	TAACTTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100

19	3	49851375	70	9-bp-Insertion	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	1-bp-Deletion	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	8-bp-Deletion	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	11-bp-Insertion	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	4-bp-Deletion	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	8-bp-Insertion	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	21-bp-Deletion	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	3-bp-Deletion	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	25-bp-Deletion	CTTTCACTTTCCTGCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	23-bp-Deletion	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	1-bp-Insertion	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	4-bp-Deletion	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	1-bp-Insertion	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	4-bp-Deletion	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	11-bp-Deletion	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	1-bp-Deletion	AG>A	15	15	0	0	n. z.
53	8	76518677	67	4-bp-Insertion	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	4-bp-Insertion	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	21-bp-Deletion	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	3-bp-Deletion	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	16-bp-Deletion	AGCGTCTATAACCAAAT>A	11	0	0	11	100

64	10	55892600	89	2-bp-Deletion	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	2-bp-Insertion	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	8-bp-Insertion	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	8-bp-Deletion	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	2-bp-Deletion	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	21-bp-Insertion	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	19-bp-Insertion	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	4-bp-Insertion	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	20-bp-Deletion	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	22-bp-Deletion	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	4-bp-Insertion	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	16-bp-Deletion	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	5-bp-Deletion	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	6-bp-Deletion	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	25-bp-Deletion	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	3-bp-Insertion	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	4-bp-Insertion	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	7-bp-Deletion	ATTATTTC>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	1-bp-Deletion	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	18-bp-Insertion	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100

109	17	16084985	93	4-bp-Insertion	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	84	1-bp-Insertion	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	24-bp-Insertion	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	4-bp-Deletion	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	12-bp-Deletion	TTTGATCTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	22-bp-Insertion	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	3-bp-Insertion	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	2-bp-Deletion	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	15-bp-Deletion	TACTTGAGAACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	5-bp-Insertion	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	11-bp-Insertion	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	16-bp-Deletion	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30300873	66	11-bp-Insertion	G>GATAAAACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	21-bp-Deletion	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	5-bp-Deletion	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	6-bp-Insertion	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	5-bp-Insertion	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	10-bp-Deletion	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

Studie 2

In dieser Studie wurden eingelagerte formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Darmkrebs-Gewebeproben und ein repräsentativer Zwei-Gen-Assay verwendet und mit der bidirektionalen Sequenzierung nach Sanger (Referenzmethode) verglichen. Von den insgesamt 1.183 getesteten Studienproben erzielten 441 sowohl mit der

Sequenzierung nach Sanger als auch mit dem repräsentativen Assay gültige Ergebnisse. Bei der Beurteilung auf Studienproben-Level (Tabelle 15) wurden mit der Sanger-Sequenzierung 230 der 441 Studienproben als positiv ausgewiesen (Mutation von Sanger erkannt). Der repräsentative Assay wies 227 positive Proben aus. Die restlichen 211 der 441 Studienproben waren gemäß Sanger negativ (keine Mutation von Sanger erkannt). Der repräsentative Assay wies 206 negative Proben aus. Dies ergab eine positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) von 98,7 % und eine negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) von 97,6 % (Tabelle 15).

Tabelle 15 Positive und negative prozentuale Übereinstimmung aus den Ergebnissen auf Studienproben-Level

Repräsentativer Assay	Sanger		Summe
	Positiv	Negativ	
Positiv	227 ¹	5	232
Negativ	3 ²	206	209
Summe	230	211	441

Leistungszusammenfassung

Übereinstimmungsstatistik	Punktschätzung	Konkretes 95%-KI
PPA	227/230 = 98,7 %	[96,2 %, 99,7 %]
NPA	206/211 = 97,6 %	[94,6 %, 99,2 %]

¹Es gab 224 genaue Übereinstimmungen für Ergebnisse auf allen Mutationsebenen innerhalb der Proben. Bei zwei Proben erkannte MiSeqDx die von Sanger erkannte Mutation und eine zusätzliche Mutation. Bei einer Probe erkannten MiSeqDx und Sanger unterschiedliche Mutationen.

²In einer Probe wurden von Sanger zwei Mutationen erkannt, in zwei Proben wurden von Sanger eine Mutation erkannt.

Studie 3

Diese Studie untersuchte DNA-Bibliotheken, die aus FFPE-Proben verschiedener Gewebetypen vorbereitet wurden. Insgesamt handelte es sich um 109 FFPE-Proben aus acht verschiedenen Gewebetypen (Dickdarm, Eierstock, Bauchspeicheldrüse, Nebenniere, Blase, Leber, Schilddrüse und Brust) mit mindestens 11 FFPE-Proben für jeden Gewebetyp. Das Nebennierengewebe enthielt Metastasen aus Ösophagus-, Lungen- und Dickdarm-Tumoren, die anderen Gewebe wiesen Primärtumore auf. Die Studie verwendete einen repräsentativen Assay, der dafür ausgelegt ist, 26 Gene abzufragen, die 21.577 Basen über 17 verschiedene Chromosomen hinweg abdecken. Es wurden insgesamt sechs unterschiedliche Gene (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* und *BRAF*) nach der Sanger-Methode sequenziert, wobei für jeden Tumor 1–3 Gene sequenziert wurden, basierend auf der erwarteten Prävalenz somatischer Mutationen für diesen Tumor. Die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung identifizierten 39 somatische SNV-Mutationen in 33 von 109 FFPE-Proben. Das MiSeqDx-System identifizierte 36 somatische SNV-Mutationen in 32 von 109 FFPE-Proben mit einem falsch negativen Call sowie zwei Variantenpositionen mit No-Call-Ergebnissen. Die PPA betrug 97,3 %. Das MiSeqDx-System identifizierte 78.975 Referenzbasen über die 109 FFPE-Proben hinweg mit 29 falsch positiven im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung und 2.437 „No Calls“. Die NPA betrug 99,9 %. Eine Zwei-Basen-Deletion war bei beiden Methoden übereinstimmend. Tabelle 16 fasst die Ergebnisse nach Gewebetyp zusammen.

Tabelle 16 Positive und negative prozentuale Übereinstimmung nach Gewebetyp

Gewebetyp	Anzahl Proben	Gesamtzahl Varianten	Gesamtzahl TP-Varianten	Gesamtzahl FN-Varianten	Gesamtzahl TN-Calls	Gesamtzahl FP-Calls	Gesamtzahl „No Calls“	PPA	NPA
Nebennieren	16	6	4	1	11.823	2	607	80	> 99,9
Blase	12	4	4	0	7.070	3	273	100	> 99,9
Brust	16	3	3	0	13.439	7	479	100	99,9
Dickdarm	11	6	5	0	8.720	2	133	100	> 99,9
Leber	13	3	3	0	7.984	1	59	100	> 99,9
Eierstock	13	7	7	0	10.581	1	724	100	> 99,99
Bauchspeicheldrüse	17	7	7	0	11.929	12	489	100	99,9
Schilddrüse	11	3	3	0	7.429	1	652	100	> 99,9
Summe	109	39	36	1	78.974	29	3.416	97,3	> 99,9

Reproduzierbarkeit

Zur Bewertung der Reproduzierbarkeit des MiSeqDx-Geräts wurden zwei Studien mit aus FFPE-Proben extrahierter DNA durchgeführt. Studie 1 wurde mit mehreren Geräten durchgeführt und Studie 2 erfolgte an mehreren Standorten.

Studie 1

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des MiSeqDx-Geräts führten zwei ausgebildete Bediener auf zwei Geräten insgesamt acht Läufe durch. Der repräsentative Assay, der Amplikon-Genominhalt, die Proben und die Referenzmethode waren die gleichen wie bei der oben beschriebenen Studie 1. Die Ergebnisse werden für jedes Gerät pro Amplikon dargestellt (Tabelle 17), um die Calling-Reproduzierbarkeit auf den Geräten nachzuweisen. „% korrekte Calls“ berücksichtigte falsche und „No Calls“ (ein oder mehrere Filter für das Varianten-Calling wurden nicht passiert). Die Geräte erzeugten für ein bestimmtes Amplikon eine ähnliche Anzahl von „No Calls“. Auf MiSeqDx 1 wurde innerhalb eines gemäß dem Referenzstandard „Platinum Genomes“ als zuverlässig definierten Bereichs ein einziger falscher Call beobachtet. Bei dem falschen Call handelte es sich um einen falsch positiven Call einer Insertionsvariante in Amplikon 64, bei der Abfrage von Chromosom 10 an den Positionen 55892599 bis 55892687. Das Amplikon wies eine Dinukleotid-Wiederholung von 11 auf.

Tabelle 17 Ergebnisse der Studie zur Reproduzierbarkeit für das MiSeqDx-Gerät (Amplikon-Level)

Amplikon	Chromosom	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Inhalt	M70215			M70217		
						Gesamtzahl korrekter Calls	Gesamtzahl falscher Calls	Gesamtzahl „No Calls“	Gesamtzahl korrekter Calls	Gesamtzahl falscher Calls	Gesamtzahl „No Calls“
1	1	93	93	Indel	0,22	5.580	0	0	5.580	0	0
2	1	79	79	PolyA (5), PolyC (5), Indel	0,38	4.740	0	0	4.740	0	0
3	1	91	91	Indel	0,4	5.448	0	12	5.453	0	8
4	1	92	92	Indel	0,49	5.518	0	2	5.518	0	2
5	1	81	81	PolyG (5)	0,69	4.858	0	2	4.860	0	0
6	1	70	70	PolyT (10), Indel	0,39	4.200	0	0	4.200	0	0
7	1	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), Indel	0,27	5.279	0	1	5.279	0	1
8	2	90	90	Indel	0,28	5.400	0	0	5.400	0	0
9	2	80	80	Indel	0,38	4.800	0	0	4.800	0	0
10	2	85	81	n. z.	0,65	4.859	0	1	4.859	0	1
11	2	75	75	PolyA (8)	0,35	4.468	0	40	4.468	0	40
12	2	88	88	PolyT (5)	0,42	5.280	0	0	5.280	0	0
13	2	87	87	PolyT (5), Indel	0,31	5.211	0	43	5.214	0	40
14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), Indel	0,3	5.453	0	7	5.449	0	11
15	2	93	93	n. z.	0,43	5.579	0	1	5.579	0	1
16	2	73	73	PolyT (5), Indel	0,42	4.378	0	2	4.379	0	1
17	3	93	93	AT(3), Indel	0,27	5.396	0	184	5.396	0	184

18	3	83	83	n. z.	0,43	4.980	0	0	4.980	0	0
19	3	70	70	CT(3), Indel	0,49	4.193	0	7	4.194	0	6
20	3	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	5.220	0	120	5.220	0	120
21	3	75	74	Indel	0,57	4.432	0	8	4.432	0	8
22	4	78	78	PolyA (6)	0,26	4.676	0	4	4.676	0	4
23	4	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	5.820	0	0	5.820	0	0
24	4	78	78	n. z.	0,29	4.679	0	1	4.677	0	3
25	4	66	62	PolyA (5), Indel	0,36	3.720	0	0	3.720	0	0
26	4	71	69	PolyA (5)	0,46	4.140	0	0	4.140	0	0
27	4	62	62	PolyA (7), Indel	0,27	3.676	0	45	3.671	0	51
28	5	78	75	n. z.	0,78	3.368	0	1.132	3.485	0	1.015
29	5	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	5.040	0	0	5.040	0	0
30	5	64	64	n. z.	0,39	3.840	0	0	3.840	0	0
31	5	83	83	PolyA (6), Indel	0,3	4.979	0	1	4.980	0	0
32	5	67	67	PolyT (5)	0,37	4.020	0	0	4.020	0	0
33	5	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	5.460	0	0	5.460	0	0
34	5	75	75	Indel	0,43	4.498	0	6	4.500	0	1
35	6	102	102	PolyG (6)	0,68	6.120	0	0	6.120	0	0
36	6	92	92	Indel	0,63	5.520	0	0	5.520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), Indel	0,61	5.532	0	108	5.532	0	108

38	6	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	5.820	0	60	5.820	0	60
39	6	95	95	Indel	0,53	5.697	0	3	5.698	0	2
40	6	86	86	PolyC (6)	0,7	5.159	0	1	5.160	0	0
41	6	95	94	PolyG (5), Indel	0,61	5.638	0	2	5.638	0	2
42	6	91	91	PolyA (5)	0,44	5.460	0	0	5.460	0	0
43	7	73	73	n. z.	0,44	4.380	0	0	4.380	0	0
44	7	88	88	Indel	0,35	5.279	0	1	5.276	0	4
45	7	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	5.184	0	36	5.181	0	39
46	7	85	85	Indel	0,38	5.100	0	0	5.100	0	0
47	7	90	90	PolyG (5), Indel	0,62	5.398	0	2	5.399	0	1
48	7	91	91	PolyG (6), PolyC (6), Indel	0,71	5.460	0	0	5.459	0	1
49	7	81	66	n. z.	0,31	3.960	0	0	3.960	0	0
50	7	93	93	Indel	0,35	5.580	0	0	5.579	0	1
51	8	83	83	n. z.	0,42	4.980	0	0	4.980	0	0
52	8	90	89	PolyG (7), CTC(4), Indel	0,61	5.219	0	121	5.220	0	120
53	8	67	67	Indel	0,3	4.020	0	0	4.020	0	0
54	9	98	98	PolyG (6)	0,67	5.879	0	1	5.880	0	0
55	9	65	65	Indel	0,32	3.894	0	6	3.895	0	5
56	9	96	96	n. z.	0,49	5.760	0	0	5.760	0	0
57	9	83	83	AT(3)	0,37	4.973	0	7	4.978	0	2

58	9	97	97	PolyC (6), Indel	0,68	5.817	0	3	5.818	0	2
59	10	79	78	PolyG (5), Indel	0,47	4.679	0	1	4.680	0	0
60	10	98	91	GC(3)	0,87	450	0	5.010	632	0	4.828
61	10	79	79	PolyT (5)	0,3	4.740	0	0	4.740	0	0
62	10	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	5.400	0	0	5.400	0	0
63	10	95	95	Indel	0,35	5.699	0	1	5.699	0	1
64	10	89	88	AC(11), Indel	0,42	5.157	0	276	5.153	2	273
65	10	80	80	n. z.	0,49	4.800	0	0	4.800	0	0
66	10	81	81	n. z.	0,51	4.860	0	0	4.860	0	0
67	11	97	96	n. z.	0,45	5.760	0	0	5.760	0	0
68	11	70	70	Indel	0,46	4.199	0	2	4.200	0	1
69	11	100	100	n. z.	0,65	5.999	0	1	5.998	0	2
70	11	62	62	Indel	0,37	3.720	0	0	3.720	0	0
71	11	102	102	n. z.	0,59	6.120	0	0	6.118	0	2
72	11	73	73	PolyA (5)	0,4	4.380	0	0	4.380	0	0
73	11	85	85	n. z.	0,42	5.100	0	0	5.100	0	0
74	11	91	91	PolyG (6)	0,55	5.437	0	23	5.441	0	19
75	11	85	85	Indel	0,53	5.100	0	0	5.100	0	0
76	11	85	85	PolyA (5), CA(3), Indel	0,34	5.100	0	0	5.100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5.100	0	0	5.100	0	0
78	12	84	84	PolyC (5), Indel	0,52	5.040	0	60	5.038	0	63

79	12	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	5.577	0	3	5.573	0	7
80	12	81	81		0,49	4.860	0	0	4.860	0	0
81	12	71	71	PolyA (6)	0,35	4.260	0	0	4.260	0	0
82	12	95	95	PolyG (5)	0,68	5.605	0	95	5.605	0	95
83	13	73	73	n. z.	0,52	4.380	0	0	4.379	0	1
84	13	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), Indel	0,22	5.220	0	60	5.220	0	60
85	13	89	89	Indel	0,49	5.340	0	0	5.340	0	0
86	13	77	77	Indel	0,39	4.620	0	0	4.620	0	0
87	14	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	4.020	0	0	4.020	0	0
88	14	83	83	n. z.	0,25	4.980	0	0	4.980	0	0
89	14	73	72	PolyT (5), Indel	0,19	4.173	0	147	4.173	0	147
90	14	81	81	Indel	0,38	4.860	0	2	4.860	0	0
91	14	91	91	Indel	0,35	5.459	0	1	5.460	0	0
92	14	66	66	PolyA (5)	0,41	3.900	0	240	3.900	0	240
93	14	94	94	Indel	0,62	5.637	0	3	5.637	0	3
94	15	98	96	PolyC (5)	0,45	5.760	0	0	5.760	0	0
95	15	68	68	Indel	0,25	4.079	0	1	4.078	0	2
96	15	95	93	PolyG (5), Indel	0,68	5.475	0	105	5.487	0	93
97	15	95	95	PolyT (6)	0,43	5.699	0	1	5.700	0	0
98	15	72	71	Indel	0,65	4.260	0	0	4.260	0	0
99	15	91	91	n. z.	0,36	5.460	0	0	5.460	0	0

100	15	70	70	Indel	0,56	4.200	0	0	4.200	0	0
101	16	63	63	n. z.	0,27	3.780	0	0	3.780	0	0
102	16	95	95	PolyC (5)	0,67	5.700	0	0	5.700	0	0
103	16	87	87	TA(3)	0,41	5.220	0	0	5.220	0	0
104	16	104	104	PolyC (5)	0,67	6.238	0	3	6.238	0	3
105	16	91	91	PolyT (5), Indel	0,37	5.443	0	17	5.444	0	16
106	17	89	89	GC(3)	0,64	5.251	0	89	5.339	0	1
107	17	87	87	PolyC (5), Indel	0,67	5.212	0	8	5.212	0	8
108	17	91	91	Indel	0,46	5.459	0	1	5.459	0	1
109	17	93	93	Indel	0,26	5.580	0	0	5.580	0	0
110	17	91	89	PolyT (5)	0,54	5.340	0	0	5.340	0	0
111	17	84	82	PolyA (13), Indel (x2)	0,29	4.860	0	308	4.860	0	307
112	17	91	91	PolyA (5)	0,34	5.459	0	1	5.459	0	1
113	17	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), Indel	0,26	5.460	0	60	5.460	0	60
114	17	79	79	Indel	0,41	4.699	0	41	4.700	0	40
115	17	86	86	PolyT (7)	0,22	5.153	0	7	5.156	0	4
116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5.039	0	1	5.039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4.020	0	0	4.020	0	0
118	18	91	91	n. z.	0,37	5.460	0	0	5.460	0	0
119	18	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	4.132	0	8	4.131	0	9
120	18	75	75	PolyA (5), Indel	0,37	4.475	0	85	4.480	0	79

121	18	81	81	CTC(3), Indel	0,47	4.860	0	0	4.860	0	0
122	18	85	85	CT(3), Indel	0,45	5.098	0	2	5.098	0	2
123	18	65	65	n. z.	0,48	3.900	0	0	3.900	0	0
124	19	99	99	n. z.	0,59	5.926	0	14	5.924	0	16
125	19	74	74	n. z.	0,68	4.440	0	0	4.438	0	2
126	19	70	70	n. z.	0,64	4.199	0	1	4.200	0	0
127	20	94	94	n. z.	0,61	5.640	0	1	5.638	0	3
128	20	82	82	AC(3)	0,59	4.920	0	0	4.920	0	0
129	20	76	76	CT(3)	0,58	4.559	0	1	4.558	0	2
130	20	70	70	GT(3),TG(4), Indel	0,46	4.200	0	0	4.200	0	0
131	20	101	101	Indel	0,63	6.060	0	0	6.060	0	0
132	20	67	67	Indel	0,36	4.020	0	31	4.020	0	25
133	20	91	88	PolyG (6)	0,73	5.277	0	3	5.274	0	6
134	20	87	87	Indel	0,57	5.218	0	2	5.218	0	2
135	21	66	66	Indel	0,35	3.959	0	1	3.957	0	3
136	21	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	5.880	0	0	5.880	0	0
137	21	87	87	GT(3), Indel	0,39	5.220	0	0	5.220	0	0
138	21	69	69	PolyA (6), AG(3), Indel	0,32	4.119	0	31	4.113	0	37
139	21	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	5.399	0	1	5.399	0	1
140	22	100	100	Indel	0,63	5.998	0	7	5.997	0	5
141	22	97	97	n. z.	0,68	5.819	0	1	5.819	0	1

142	22	97	97	Indel	0,46	5.818	0	2	5.816	0	4
143	22	99	99	n. z.	0,6	5.940	0	0	5.940	0	0
144	22	92	92	Indel	0,66	5.519	0	1	5.519	0	1
145	X	69	69	PolyT (5)	0,26	4.139	0	1	4.140	0	0
146	X	69	69	PolyC (5)	0,62	4.136	0	4	4.137	0	3
147	X	71	71	n. z.	0,52	4.260	0	0	4.260	0	0
148	Y	65	0	n. z.	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	n. z.	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Die Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsstudie wurden pro Bediener unter Verwendung der Variantenhäufigkeit analysiert (Tabelle 18). Diese Analyse zeigte, dass die Variantenhäufigkeiten bedienerübergreifend konsistent waren. Dargestellt ist die mittlere Variantenhäufigkeit und die +/-1-Standardabweichung.

Tabelle 18 Bedienerabhängige Ergebnisse für das MiSeqDx-Gerät

Bereich der Variantenhäufigkeit	Anzahl eindeutiger Varianten	Gesamtzahl analysierter Varianten Bediener 1	Gesamtzahl analysierter Varianten Bediener 2	Mittlere (SD) berichtete Variantenhäufigkeit Bediener 1	Mittlere (SD) berichtete Variantenhäufigkeit Bediener 2
Hohe Häufigkeit (ca. 100 %)	1.112	1.072	1.072	0,96 +/- 0,05	0,96 +/- 0,05
Mittlere Häufigkeit (ca. 50 %)	3.240	3.151	3.161	0,49 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04
Geringe Häufigkeit (3–7 %)	620	618	612	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01

Die Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsstudie für jede Probe werden für alle acht Läufe zusammengefasst aufgeführt (Tabelle 19). Die Erkennung wird für jeden Variantentyp – SNVs, Insertionen und Deletionen – separat evaluiert. Referenzierte Positionen sind ausgeschlossen. Diese Analyse zeigt, dass die Ergebnisse für die Varianten über die Proben hinweg reproduziert werden konnten.

Tabelle 19 Übereinstimmung der Base-Call-Ergebnisse des MiSeqDx-Geräts je Probe

Probe	SNVs				Insertionen				Deletionen			
	Gesamtzahl	Gesamtzahl TP	Gesamtzahl FP	Gesamtzahl FN	Gesamtzahl	Gesamtzahl TP	Gesamtzahl FP	Gesamtzahl FN	Gesamtzahl	Gesamtzahl TP	Gesamtzahl FP	Gesamtzahl FN
GM12877	592	574	2	0	336	336	0	0	228	272	0	0
GM12878	1.456	1.432	0	0	320	304	0	0	384	352	0	0
GM12879	912	896	0	0	336	320	0	0	288	272	0	0
GM12885	1.200	1.192	0	0	400	384	0	0	352	320	0	0
GM12886	1.104	1.104	0	0	368	352	0	0	368	352	0	0
GM12877-D1 ¹	3.640	3.582	0	0	800	760	0	0	960	880	0	0
GM12877-D2 ²	400	398	0	0	520	516	0	0	560	556	0	0

¹ Varianten mit einer Häufigkeit von mehr als 20 %.

² Varianten mit einer Häufigkeit von weniger als 20 %.

Die von den acht Läufen der Reproduzierbarkeitsstudie gelieferten Daten unterstützen die Aussage, dass das MiSeqDx-Gerät Folgendes konsistent sequenzieren kann:

- GC-Inhalt ≥ 19 % (alle Base-Calls in 120 von 120 sequenzierten Amplikons mit 19 % GC-Inhalt erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 3,4 %)
- GC-Inhalt ≤ 73 % (alle Base-Calls in 120 von 120 sequenzierten Amplikons mit 73 % GC-Inhalt erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 0,1 %)
- PolyA-Längen ≤ 8 (PolyA-Wiederholung von acht Nukleotiden mit korrekten Calls in 120 von 120 sequenzierten Amplikons, die PolyA = 8 enthalten)
- PolyT-Längen ≤ 10 (PolyT-Wiederholung von 10 Nukleotiden mit korrekten Calls in 120 von 120 sequenzierten Amplikons, die PolyT = 10 enthalten)
- PolyG-Längen ≤ 6 (PolyG-Wiederholung von sechs Nukleotiden mit korrekten Calls in 720 von 720 sequenzierten Amplikons, die PolyG = 6 enthalten)
- PolyC-Längen ≤ 6 (PolyC-Wiederholung von sechs Nukleotiden mit korrekten Calls in 359 von 360 sequenzierten Amplikons, die PolyC = 6 enthalten, mit einem „No Call“)
- Längen von Dinukleotid-Wiederholungen ≤ 4 -fach (alle Base-Calls in 600 von 600 sequenzierten Amplikons mit 4-facher Dinukleotid-Wiederholung erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 0,4 %)

- Längen von Trinukleotid-Wiederholungen ≤ 5 -fach (alle Base-Calls in 120 von 120 sequenzierten Amplikons mit 5-facher Trinukleotid-Wiederholung erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 1,9 %)
- 24-Basen-Insertionen oder geringer und 25-Basen-Deletionen oder geringer
 - 24-Basen-Insertionen hatten in 120 von 120 Proben korrekte Calls
 - 25-Basen-Deletionen hatten in 182 Proben korrekte Calls und in zwei von 184 Proben gemeldete „No Calls“

Studie 2

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit des in der Genauigkeitsstudie 2 beschriebenen repräsentativen Zwei-Gen-Assays wurde eine externe Studie mit einer Reagenzien-Charge an drei externen Prüfstandorten (zwei Bediener pro Standort) und an drei nicht aufeinander folgenden Prüftagen durchgeführt. Bei den Tests wurden sechs gut charakterisierte Probenpanels mit Proben genomischer DNA aus klinischen FFPE-Proben oder Zelllinien verwendet. Jedes Panel enthielt 10 Bestandteile, d. h., insgesamt wurden 60 Bestandteile einbezogen.

Die 60 Bestandteile der Panels umfassten Duplikate von vier eindeutigen Wildtypproben (für Panel-Mutationen) und 12 eindeutige Mutationsproben (mit einer einzelnen Mutation), die mit niedrigen und hohen Mutationshäufigkeits-Levels vorbereitet wurden, sowie zwei eindeutige Mutationsproben (mit einer einzelnen Mutation) mit ausschließlich niedrigem Mutationshäufigkeits-Level. Jede eindeutige Probe bzw. Probe mit Mutationshäufigkeits-Level (in jedem Lauf doppelt getestet) führte zu 36 möglichen Ergebnissen (2 Replikate \times 2 Bediener \times 3 Tage \times 3 Standorte), sofern alle Ergebnisse gültig waren.

Der Prozentsatz erwarteter Calls (Percent Expected Call, PEC) über alle positiven und negativen Varianten hinweg wurde durch Vergleich des Ergebnisses des repräsentativen Assays mit dem erwarteten Mutationsergebnis (erwartete Mutation erkannt oder nicht erkannt) jeder Probe berechnet. Der PEC wird berechnet als 100 % multipliziert mit der Anzahl der erwarteten Calls geteilt durch die Anzahl der versuchten Calls. Das zweiseitige 95%-Konfidenzintervall wird nach der Wilson-Methode berechnet.

Bei der Zusammenfassung der Standorte waren die Proben-Pass-Raten beim ersten Lauf der Probe bzw. bei getesteten Proben in Läufen, die im ersten Durchgang gültig waren, $\geq 94,7$ %. Der PEC auf Mutationsebene über alle Mutationsproben hinweg betrug 99,6 % (905/909) (95%-KI, 98,9, 99,8). Die Anzahl der versuchten Calls über alle 56 Panel-Mutationen hinweg (unabhängig davon, ob eine erkannte Mutation erwartet wurde oder nicht) betrug für alle gültigen Proben 58.856 (56×1.051). Bei den 58.856 Calls auf Mutationsebene wurden nur sechs Fälle mit einer Diskordanz zwischen dem erwarteten und dem tatsächlichen Ergebnis beobachtet. Der PEC auf Mutationsebene über alle positiven und negativen Varianten der Mutations- und Wildtyp-Bestandteile aller Panels hinweg betrug 99,99 % (58.850/58.856).

Analytische Sensitivität (Leerwertgrenze (Limit of Blank, LoB) und Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD))

Diese Studie verifiziert den Assay-Cutoff und bestimmte die LoD für das MiSeqDx-Gerät mit einem repräsentativen Panel. Dazu wurden die gut charakterisierten Platinum-Genome-Zelllinien GM12878 und GM12877 formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurde die DNA extrahiert. GM12878 wurde mit GM12877 verdünnt, sodass die Variantenhäufigkeiten von 70 Varianten (52 SNVs, neun Insertionen und neun Deletionen) bei annähernd 0,05 lagen. Die beiden DNA-Proben wurden von zwei Bedienern mit zwei Geräten und zwei Reagenzien-Chargen in insgesamt 10 MiSeqDx-Sequenzierungsläufen getestet. Dies resultierte in 40 Replikaten pro Variante in GM12878 und 60 Replikaten pro entsprechender Wildtyp-Koordinate in GM12877 für jede Reagenzien-Charge. Die LoB- und LoD-Werte wurden nach dem im CLSI-Standard EP17-A2 dargelegten klassischen Ansatz unter Verwendung der nichtparametrischen Option berechnet. LoB und LoD wurden für SNVs, Insertionen und Deletionen separat berechnet, indem die Variantenhäufigkeiten für einen gegebenen Variantentyp gepoolt wurden. Der Typ-I-Fehler wurde mit 0,01 und der Typ-II-Fehler mit 0,05 definiert.

Für die LoB wurden die gepoolten Variantenfrequenzen aufsteigend sortiert und es wurde die 99. Rangposition für jede Reagenziencharge und für jeden Variantentyp berechnet (Tabelle 20). Die MiSeqDx-Software verwendet einen Cutoff (die effektive Leerwertgrenze) von einer 0,026-Variantenhäufigkeit zur Festlegung der qualitativen Erkennung von Varianten. Die berechneten LoB-Werte weisen nach, dass dieser Cutoff zu einem Typ-I-Fehler von nicht mehr als 0,01 führt.

Tabelle 20 Leerwertgrenze

Variantentyp	Gesamtzahl der Variantenhäufigkeiten	LoB Reagenziencharge 1 (%)	LoB Reagenziencharge 2 (%)
SNV	3.120	0,87	0,75
Insertion	540	0,79	0,60
Deletion	540	0,96	0,84

Zur Berechnung des LoD-Werts wurde für jede Reagenziencharge und für jeden Variantentyp, der unter den Cutoff von 0,026 fällt, der Prozentsatz der individuellen Mutationshäufigkeit berechnet (Tabelle 21). Da die Prozentsätze geringer waren als der Typ-II-Fehler von 5 % (0,05), wurde der Median der kombinierten Variantenhäufigkeiten als LoD berechnet (Tabelle 22). Als LoD für jeden Variantentyp wurde der größere der beiden für die zwei Reagenzienchargen berechneten Werte genommen – 5,45 % für SNVs, 4,88 % für Insertionen und 5,44 % für Deletionen.

Tabelle 21 Nachweisgrenze

Reagenziencharge	Variantentyp	Gesamtzahl der Variantenhäufigkeiten	Anzahl der VF-Messungen < 2,6 %	% der VF-Messungen < 2,6 %	Nachweisgrenze (%)
1	SNV	2.080	5	0,20	5,45
	Insertion	360	0	0,00	4,86
	Deletion	360	3	0,80	5,44
2	SNV	2.080	26	1,30	5,44
	Insertion	360	0	0,00	4,88
	Deletion	360	0	0,00	5,24

Die folgenden Studien zeigen die Leistungsmerkmale des MiSeqDx mit einem weiteren repräsentativen Assay, der auf 56 Mutationen in zwei klinisch relevanten Krebsgenen (Mutationspanel) abzielt. Das Mutationspanel ist darauf ausgelegt, 56 Mutationen in zwei klinisch relevanten Krebsgenen (Gen 1 und Gen 2) spezifisch

nachzuweisen. Der Assay ermittelt gleichzeitig die Anwesenheit und Abwesenheit jeder der 56 Mutationen in jeder sequenzierten Probe. Die Referenzmethode für diese Studien war die bidirektionale Sanger-Sequenzierung.

Chargenabhängige Präzision

Es wurde eine Studie zur chargenabhängigen Präzision durchgeführt, um die Leistung des MiSeqDx-Geräts über hergestellte Reagenzien-Kit-Chargen hinweg (darunter Probenqualifizierungs-, Bibliotheksvorbereitungs- und Sequenzierungsreagenzien) zu bewerten. Dazu wurde ein repräsentativer Zwei-Gen-Assay mit einem Panel von fünf gemischten FFPE-Proben verwendet, die die Probenqualifikationsanforderungen erfüllen. Jede FFPE-Probe enthielt zwei eindeutige Mutationen: eine auf einem niedrigeren Mutationshäufigkeits-Level (etwa 8 %) und eine auf einem hohen Mutationshäufigkeits-Level (ungefähr 14 %). An drei nicht aufeinander folgenden Tagen wurden 12 Beobachtungen von jedem der fünf Probenmischungen mit drei Reagenzien-Kit-Chargen gesammelt. Die Gesamtzahl der Beobachtungen für die Studie über alle Reagenzienchargen lag bei 180 Beobachtungen über alle Probenmischungen und bei 360 Beobachtungen über alle Mutationshäufigkeits-Levels hinweg. Über alle Chargen und Tage hinweg zeigten 99,7 % (359/360) der Beobachtungen das erwartete Mutationsergebnis. Eine Mutation mit geringer Häufigkeit ergab einen falschen Call als Wildtyp. Für jede der Mutationen/Mutationshäufigkeits-Levels wurde eine Varianzkomponentenanalyse durchgeführt, um die Variabilität des Systems zu schätzen. Die Gesamtstandardabweichung lag zwischen 0,011 und 0,029. Die Reagenzienchargenkomponente der Gesamtstandardabweichung lag zwischen 0 und 0,015.

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 Dritte.

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.

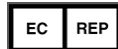
© 2020 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Illumina, MiSeqDx, TruSeq, die kürbisorange 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



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, finden Sie im Symbolschlüssel unter „support.illumina.com“ auf der Registerkarte *Documentation and Literature* (Dokumentation und Literatur) für Ihr Kit.