

## Pakkausseloste laitteille, joissa on MOS v4

IN VITRO -DIAGNOSTISEEN KÄYTTÖÖN. VAIN VIENTIIN.

## Suunniteltu käyttötarkoitus

Kun MiSeqDx-laitetta käytetään *in vitro* -diagnostisiin (IVD) määrittäisiin, se on tarkoitettu sellaisten DNA-kirjastojen kohdistettuun sekvensointiin, jotka on saatu ääreiskokoverestä tai formaliinifiksoidusta parafiinivaletusta (FFPE) kudoksesta eristetystä ihmisen genomisesta DNA:sta. MiSeqDx-laitetta ei ole tarkoitettu koko genomien sekvensointiin tai *de novo* -sekvensointiin. MiSeqDx-laitetta tulee käyttää rekisteröityjen ja lueteltujen, myyntiluvan saaneiden tai hyväksytyjen IVD-reagenssien ja analyttisen ohjelmiston kanssa.

## Menetelmän periaatteet

Illumina MiSeqDx on tarkoitettu kohdistettuun ihmisen DNA:n uudelleensekvensointiin Illumina-yhtiön sekvensointitarvikkeiden ja ääreiskokoverestä tai FFPE-kudoksesta peräisin olevasta ihmisen genomisesta DNA:sta valmistettujen kirjastojen sekä rekisteröityjen ja lueteltujen, myyntiluvan saaneiden tai hyväksytyjen IVD-reagenssien avulla. Kirjastot valmistellaan monistamalla kohteita ja lisäämällä näyteindeksejä ja kaappaussekvenssejä. Näytekirjastot kaapataan virtauskyvettiin ja sekvensoidaan instrumenttiin synteessin (SBS-kemian) avulla. SBS-kemiassa käytetään palautuvan terminaattorin menetelmää yksittäisten nukleotidien toteamiseen, kun ne sisällytetään kasvaviin DNA-juosteisiin. Real-Time Analysis (RTA) on ohjelmisto, joka suorittaa kuva-analyysin ja emäksen tunnistamisen ja antaa laatupisteytyksen kullekin emäkselle kussakin sekvensointijaksossa. Kun ensisijainen analyysi päättyy, MiSeqDx-laitteen toissijainen analyysi käsittelee emästen tunnistukset.

Käsittely sisältää yleensä demultipleksoinnin, FASTQ-tiedoston luonnin, kohdistuksen, variantin tunnistuksen ja varianttintunnistusmuotoisten (VCF) tiedostojen luomisen, jotka sisältävät tietoja viitegenomin tietyissä paikoissa löydetystä varianteista. MiSeqDx käyttää erilaisia moduuleja toissijaista analyysia varten työnkulun perusteella.

## Kaksoiskäynnistyksen määrittäminen

Kaksoiskäynnistyksen sisältäminen sisältää laitteiston, ohjelmiston ja asennustoimenpiteet, joiden avulla MiSeqDx-laite voi suorittaa sekä *in vitro* -diagnostisia (IVD) että vain tutkimuskäyttöön tarkoitettuja (RUO) sekvensointimäärittämiä. Kaksoiskäynnistyksen avulla voidaan vaihtaa laitteen diagnostisesta tilasta laitteen tutkimustilaan. Sekvensointitarvikkeiden RFID (radio-frequency identifications) -tunnisteet estävät RUO-tilan sekvensointireagenssien käyttämisen diagnostisissa sekvensointiajoissa.

# Menetelmän rajoitukset

- *In vitro* -diagnostiseen käyttöön.
- Tuotetiedoissa esitetyt tulokset saatiin edustavilla määrityspaneelilla käyttämällä perifeeristä kokoverta tai sukusolulinjoja ja FFPE-kudosta tai FFPE-solulinjoja somaattiseen toimintaan kuvattujen reagenssien ja ohjelmistomoduulien kanssa. Ituratavarianttien ja somaattisten varianttien analyysimoduulit kehitettiin suorituskyvyn arvioimiseksi edustavilla määrityksillä. Suorituskykyominaisuudet on tarkoitettu vain taustatiedoksi. Esitetty validointitestausta vain esittelee laitteen yleisiä ominaisuuksia eikä määritä laitteen kykyä tai sopivuutta minkään tarkan väitteen suhteen. Kaikki tässä laitteessa käytetyiksi kehitetyt diagnostiset testit edellyttävät täydellistä validointia kaikilta suorituskyvynäkökohdilta.
- Tämä tuote on rajattu tuottamaan seuraavat:
  - sekvensoinnin tulos  $\geq 5$  Gt read-pituudella  $2 \times 150$  emäsparia (bp)
  - suodattimen läpäisevät readit  $\geq 15$  miljoonaa read-pituudella  $2 \times 150$  bp
  - Yli Q30  $\geq 80$  %:n emäkset readpituudella  $2 \times 150$  bp  
Vähintään 80 %:lla emäksiä on Phred-asteikon laatuasteet  $> 30$ , mikä osoittaa yli 99,9 %:n emästunnistustarkkuutta.
- MiSeqDx-laite on validoitu vain sekvensoimaan ihmisen DNA-kirjastoja, jotka on eristetty perifeerisestä kokoverestä tai FFPE-kudoksesta. Muista näytetyypeistä luotuja kirjastoja ei saa käyttää tämän laitteen kanssa *in vitro* -diagnostiseen käyttöön. Tämän laitteen suorituskykyä mikrobien tai virusten nukleinihappojen sekvensoinnissa kliinisistä näytteistä ei ole varmistettu.
- MiSeqDx on tarkoitettu *in vitro* -diagnostiseen käyttöön yhdessä rekisteröityjen ja lueteltujen, myyntiluvan saaneiden tai hyväksytyjen IVD-reagenssien tai määritysten kanssa. Tässä pakkauselosteessa kuvatut reagenssien rajoitukset ja suorituskykyominaisuudet perustuvat edustaviin määrityksiin ja ohjelmistomoduuleihin. IVD-määritysten osalta katso määrityskohtaisesta pakkauselosteesta käyttötarkoitus, tunnistetut variantit sekä näytetyyppi.
- Yli 25 emäsparin pituisia indeleitä (insertiot, deleetiot ja niiden yhdistelmät) ei kohdisteta määritysohjelmistossa. Tämän vuoksi indelit, joiden pituus on  $> 25$  bp, eivät ole tunnistettavissa määritysohjelmistolla.
- Järjestelmä on validoitu yksittäisen nukleotidin varianttien (SNV:t) ja pituudeltaan korkeintaan 25 emäsparin deleetioiden ja 24 emäsparin insertioiden tunnistamiseen ituraja- ja somaattisen varianttimoduulin ohjelmiston kanssa käytettäessä. Somaattista tunnistusta varten tunnistettiin 25 emäsparia deleetioita ja 18 emäsparia insertioita varianttitaajuudella 0,05.
- Amplikonireadeja, joissa on äärimmäistä varianttisisältöä, ei ehkä kohdisteta määritysohjelmistossa, jolloin alue ilmoitetaan villityypiksi. Tällainen äärimmäinen sisältö on muun muassa seuraavanlaista:
  - enemmän kuin kolme indeliä sisältävät readit
  - read-pituudet, jotka ovat vähintään 30 bp ja joiden yksittäisen nukleotidivariantin (SNV) pitoisuus on  $> 4$  % amplikonin kokonaiskohdepituudesta (koetinalueet pois lukien)

- Readit, joiden pituus on < 30 bp ja joiden SNV-sisältö on > 10 % kokonaisamplikonipituudesta (koetinalueet mukaan lukien)
- Suuret variantit, muun muassa moninukleotidivariantit (MNV:t) ja suuret indelit, voidaan ilmoittaa erillisinä pienempinä variantteina VCF-tuotostiedostossa.
- Deleetiovariantit voidaan suodattaa tai jättää huomiotta, kun alueena on kaksi vierekkäistä amplikonია, mikäli deleetiopituus on suurempi tai yhtä suuri kuin vierekkäisten amplikonien välinen päällekkäisyys.
- Järjestelmä ei pysty toteamaan indeleitä, mikäli ne ilmenevät välittömästi alukkeen vieressä ja mikäli päällekkäistä amplikonია ei ole. Alueilla, joilla on päällekkäisiä amplikoneja, määrityksellä ei voida todeta deleetioita, kun päällekkäisyysalue on pienempi kuin todettavan deleetion koko. Mikäli kahden vierekkäisen amplikonin välinen päällekkäisyysalue on esimerkiksi kaksi (2) emästä, määrityksellä ei voida todeta deleetioita, joihin molemmat emäkset sisältyvät. Yksittäisen emäksen poisto jommankumman emäksen kohdalla voidaan todeta.
- Kuten minkä tahansa hybridisaatiopohjaisen kirjaston valmistelutyönkulun yhteydessä, piilevät polymorfismit, mutaatiot, insertiot tai deleetiot oligonukleotideja sitovilla alueilla saattavat vaikuttaa tutkittaviin alleeleihin. Tämä vaikuttaa vastaavasti myös sekvensoinnin aikana tehtyihin tunnistuksiin. Esimerkkejä:
  - Varianttia faasissa, jossa on variantti alukealueella, ei ehkä amplifioida, jolloin tuloksena saadaan väärä negatiivinen tulos.
  - Alukealueella olevat variantit saattavat estää viitealleelin amplifikaation, mikä johtaa virheelliseen homotsygoottisen variantin tunnistamiseen.
  - Alukealueella olevat indelvariantit saattavat aiheuttaa väärän positiivisen tunnistuksen alukkeen vieressä olevan readin päässä.
- Indelit voidaan suodattaa juosteen vääristymän vuoksi, jos ne ilmenevät yhden readin pään lähellä ja jos ne leikataan pehmeästi kohdistuksen aikana.
- Pieniä MNV:itä ei ole validoitu.
- Kopionumerovariantteja tai rakennevariantteja, kuten fuusioita tai translokaatioita, ei ole validoitu.
- Ituratakohtaiset rajoitukset:
  - MiSeqDx-laite, jossa käytetään ituratavarianttien moduulia, on suunniteltu tuottamaan kvalitatiivisia tuloksia ituratavariantin tunnistamiseksi (esim. homotsygoottinen, heterotsygoottinen, villityyppi).
  - Sukusolulinjavarianttimoduulin kanssa käytettynä oikeelliseen variantin tunnistamiseen tarvitaan vähintään 150x:n kattavuus amplikonია kohti. Näytteiden määrä ja kohdennettujen emästen kokonaismäärä vaikuttavat kattavuuteen. GC-pitoisuus ja muu genomipitoisuus saattavat vaikuttaa kattavuuteen.
  - Jäljennösmäärien variaatio saattaa vaikuttaa siihen, tunnistetaanko variantti homotsygoottiseksi vai heterotsygoottiseksi.

- Tietyissä toistuvassa kontekstissa variantit suodatetaan pois VCF-tiedostoissa. RMxN-toistosuodatinta käytetään suodattamaan variantteja, mikäli varianttisekvenssi on osittain tai kokonaan toistuvasti läsnä varianttiaseman viitegenomissa. Sukusolulinjan variantin tunnistamisessa tarvitaan vähintään yhdeksän toistoa viitteessä, jotta variantti voidaan suodattaa, ja huomioon otetaan vain toistot, joiden pituus on enintään 5 bp (R5x9).
- Somaattis-spesifiset rajoitukset:
  - MiSeqDx-laite, jossa käytetään somaattisten varianttien moduulia, on suunniteltu antamaan kvalitatiivisia tuloksia somaattisen variantin tunnistamiseen (esim. sellaisen somaattisen variantin läsnäolo, jonka varianttitaajuus  $\geq 0,026$  ja toteamisraja 0,05).
  - Somaattisen varianttimoduulin kanssa käytettynä oikeelliseen variantin tunnistamiseen tarvitaan vähintään 450x:n kattavuus oligonukleotidipoolia kohti. Näytteiden määrä ja kohdennettujen emästen kokonaismäärä vaikuttavat kattavuuteen. GC-pitoisuus ja muu genomipitoisuus saattavat vaikuttaa kattavuuteen.
  - Tietyissä toistuvassa kontekstissa variantit suodatetaan pois VCF-tiedostoissa. RMxN-toistosuodatinta käytetään suodattamaan variantteja, mikäli varianttisekvenssi on osittain tai kokonaan toistuvasti läsnä varianttiaseman viitegenomissa. Somaattisen variantin tunnistamisessa tarvitaan vähintään kuusi toistoa viitteessä, jotta variantti voidaan suodattaa, ja huomioon otetaan vain toistot, joiden pituus on enintään 3 bp (R3x6).
  - Somaattinen varianttimoduuli ei voi tehdä eroa ituradan ja somaattisten varianttien välillä. Moduuli on suunniteltu toteamaan variantteja varianttien taajuusalueiden poikki, mutta varianttien taajuutta ei voida käyttää erottamaan somaattisia variantteja ituratavarianteista.
  - Näytteessä oleva normaali kudosisävy vaikuttaa varianttien toteamiseen. Ilmoitettu toteamisraja perustuu varianttitaajuuteen suhteessa sekä tuumorista että normaalista kudoksesta poimittuun kokonais-DNA:han.

## Tuotteen osat

Illumina MiSeqDx koostuu seuraavista:

MiSeqDx-laite (Luettelonro DX-410-1001)

Seuraavat ohjelmistokomponentit tarvitaan MiSeqDx-laitteen toimintaa ja tietanalyysiä varten:

Ohjelmistosovellus	Toiminto	Kuvaus
MiSeq-käyttöohjelmisto (MOS)	Ohjaa laitteen toimintaa	MOS-ohjelmistosovellus hallinnoi laitteen käyttöä sekvenssoinnin aikana ja tuottaa kuvia Real-Time Analysis (RTA) -ohjelmiston käyttöön. Ks. lisätietoja <i>MiSeqDx-laitteen viiteopas MOS v4:lle (asiakirjanro 200010452)</i> -oppaasta.
Real-Time Analysis (RTA)	Tuottaa ensisijaista analyysia	RTA-ohjelmisto muuntaa MOS:in luomat kuvat sekvenssintietojen jakson kullekin ruudulle emästen tunnistamistiedostoiksi, jotka ovat syötteitä Local Run Manager -analyysimoduuleille. RTA-ohjelmistosovellus ei sisällä käyttöliittymää.

Ohjelmistosovellus	Toiminto	Kuvaus
Local Run Manager	Moduulin valinnan käyttöliittymä	Local Run Manager -ohjelmisto on laitteessa suoritettava integroitu ratkaisu käyttäjähallintaan, toissijaisen analyysin suorittamiseen ja tilan valvontaan. Ks. lisätietoja oppaasta <i>Local Run Manager v4 Software Reference Guide for MiSeqDx (Local Run Manager v4 -ohjelmiston ohje MiSeqDx-laitteelle)</i> (asiakirja nro 200046657).

## Säilytys ja käsittely

Elementti	Tekniset tiedot
Lämpötila	Kuljetus ja varastointi: -10–40 °C (14–104 °F) Käyttöolosuhteet: 19–25 °C (66–77 °F)
Kosteus	Kuljetus ja varastointi: Tiivistymätön kosteus Käyttöolosuhteet: 30–75 %:n suhteellinen kosteus (tiivistymätön)

## Tarvittavat välineet ja materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

### Sekvensointitarvikkeet

MiSeqDx-reagenssisarja v3 (luettelonro 20037124)

MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (luettelonro 20063860)

### Käyttäjän hankittaviksi jäävät tarvikkeet

Varmista ennen ajon alkua, että seuraavat käyttäjän hankkimat tarvikkeet ovat käytettävissä.

Tarvike	Tarkoitus
Alkoholiliinat, 70-prosenttinen isopropanoli tai etanoli, 70-prosenttinen	Virtauskyvetin lasin tason puhdistaminen
Laboratorioliiina, vähän nukkaava	Virtauskyvetin tason puhdistaminen
Linssipaperi, 4 x 6 tuumaa	Virtauskyvetin puhdistaminen
Tween 20	Laitteen pesu
Pinsetit, neliökärki, muovia (valinnainen)	Virtauskyvetin poistaminen toimituspakkauksesta
Vesi, laboratoriokäyttöön tarkoitettu	Laitteen pesu

## Laboratoriokäyttöön tarkoitettua vettä koskevat ohjeet

Käytä laitteen toimenpiteissä aina laboratoriokäyttöön tarkoitettua vettä. Älä koskaan käytä vesijohtovettä.

Käytä vain seuraavan laatuista vettä tai vastaavia:

- deionisoitu vesi
- Illumina PW1 -vesi
- 18 megaohmin (MΩ) vesi
- Milli-Q-vesi
- Super-Q-vesi
- molekyylibiologiaan tarkoitettu vesi.

## Varoitukset ja varotoimet



### VAROITUS

**Tämä reagenssisarja sisältää mahdollisesti vaarallisia kemikaaleja. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Ilmanvaihdon on oltava asianmukaista reagensseissa olevien vaarallisten aineiden käsittelyssä. Käytä altistumisriskiä vastaavia henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojakäsineitä ja laboratoriotakkia. Käsittele käytettyjä reagensseja kemiallisena jätteenä ja hävitä ne sovellettavien alueellisten, kansallisten ja paikallisten lakien ja säädösten mukaisesti. Katso ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta osoitteessa [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).**

- Käsittele kaikkia verinäytteitä aivan kuten niissä olisi tarttuvaa ihmisen immuunikatovirusta (HIV), ihmisen hepatiitti B -virusta (HBV) ja muita veren välityksellä tarttuvia taudinaiheuttajia (yleiset varotoimet).
- Jos annettuja ohjeita ei noudateta, tuloksena voi olla virheellisiä tuloksia tai näytteiden laadun merkittävä heikentyminen.
- Noudata normaaleja laboratoriotyön varotoimia. Älä pipetoi suun avulla. Älä syö, juo tai tupakoi työhön varatuilla alueilla. Käytä kertakäyttöisiä hansikkaita ja laboratoriotakkeja, kun käsittelet näytteitä tai sarjareagensseja. Pese kädet huolellisesti näytteiden ja sarjareagenssien käsittelyn jälkeen.
- Asianmukaisten laboratoriokäytäntöjen ja hyvän laboratoriohygienian noudattaminen on välttämätöntä, jotta PCR-tuotteet eivät kontaminoi reagensseja, instrumentteja ja genomisen DNA:n näytteitä. PCR-kontaminaatio voi aiheuttaa epätarkkoja ja epäluotettavia tuloksia.
- Jotta kontaminoituminen voidaan välttää, varmista, että vahvistusta edeltävän ja sen jälkeisen työn alueilla on työvaiheisiin tarkoitettut laitteet ja tarvikkeet (esimerkiksi pipetit, pipettikärjet, koeputkiravistelijat ja sentrifugit).

- Tarvittaessa indeksin ja näytteen parinmuodostuksen tulee vastata levyn tulostettua asettelua täsmälleen. Local Run Manager täyttää näytteiden nimiin liittyvät indeksialukkeet automaattisesti moduuliin lisättäessä. Käyttäjää kehoitetaan tarkistamaan näytteisiin liitetyt indeksialukkeet ennen sekvensointiajon aloittamista. Näytteen ja alustan asettelun väliset yhteensopimattomuudet johtavat positiivisen näytteen tunnistuksen menetykseen ja virheellisen tuloksen raportointiin.
- Käyttäjän hankkiman virustorjuntaohjelman asennusta suositellaan vahvasti, jotta tietokone olisi turvassa viruksilta. Katso asennusohjeet käyttöoppaasta.
- Älä käytä MiSeqDx -laitetta, jos jokin sen paneeli on irrotettu. Jos laitetta käytetään jokin paneeli irrotettuna, vaarana on altistuminen verkko- ja tasavirtajännitteille.
- Älä koske virtauskyvetin virtauskyvettiasemaan. Siinä olevan lämmittimen lämpötila on 22–95 °C ja voi johtaa palovammoihin.
- Laite painaa noin 57 kg (126 paunaa), joten sen pudottaminen tai käsitteleminen väärin voi aiheuttaa vakavan vamman.
- Kaikista tähän tuotteeseen liittyvistä vakavista tapahtumista on välittömästi ilmoitettava Illuminalle ja toimivaltaiselle viranomaiselle siinä jäsenvaltiossa, jossa käyttäjä ja/tai potilas on.

## Käyttöohjeet

Seuraavat MiSeqDx-laitteen käyttöohjeet edellyttävät MiSeqDx-reagenssisarja v3 -sarjassa toimitettavien reagenssien käyttöä.

## Ajon luominen Local Run Manager -ohjelmistolla

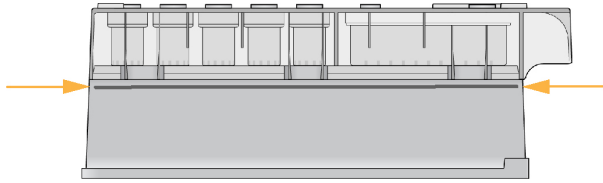
Katso ajon luomisen yksityiskohtaiset ohjeet käyttämällesi analyysimoduulille oppaasta *Local Run Manager v4 Software Reference Guide for MiSeqDx (Local Run Manager v4 -ohjelmiston ohje MiSeqDx-laitteelle)* (asiakirja nro 200046657) ja Local Run Manager-moduulin oppaasta.

## Reagenssikasetin valmistelu

Seuraavissa ohjeissa kuvataan, miten reagenssit sulatetaan huoneenlämpöisessä vesihauteessa.

1. Ota reagenssikasetti –25 – –15 °C:n säilytyslämpötilasta.
2. Aseta reagenssikasetti vesihauteeseen, jossa on riittävästi huoneenlämpöistä deionisoitua vettä, jotta reagenssikasetin pohja uppoaa veteen reagenssikasettiin painettuun vesirajaan saakka. Älä anna veden ylittää enimmäisvesirajaa.

Kuva 1 Enimmäisvesiraja



3. Anna reagenssikasetin sulaa huoneenlämmössä noin 60–90 minuuttia tai kunnes se on sulanut kokonaan.
4. Poista kasetti vesihautteesta ja naputa sitä kevyesti työtasolla veden poistamiseksi kasetin pohjasta. Kuivaa kasetin pohja. Varmista, että vettä ei ole roiskunut reagenssikasetin yläosaan.

## Reagenssikasetin tarkistaminen

1. Kääntelee reagenssikasettia kymmenen kertaa sulaneiden reagenssien sekoittamiseksi ja tarkista sitten, että kaikki asemat ovat sulaneet.
2. Tarkista reagenssit asemissa 1, 2 ja 4 varmistaaksesi, että ne ovat kokonaan sekoittuneet ja että niissä ei ole sakkaa.

**HUOMAUTUS** On ratkaisevan tärkeää, että kasetin reagenssit ovat täysin sulaneet ja sekoittuneet, jotta voidaan varmistaa asianmukainen sekvensointi.

3. Napauta kasettia varovasti työtason päällä reagenssien ilmakuplien vähentämiseksi.

**HUOMAUTUS** MiSeqDx-annostelijaputket siirtyvät kunkin säiliön pohjaan reagenssien aspirointia varten, joten on tärkeää, että säiliöissä ei ole ilmakuplia.

4. Aseta reagenssikasetti jäälle tai siirrä se syrjään 2–8 °C:n lämpötilaan (enintään kuudeksi tunniksi), kunnes olet valmis määrittämään ajon. Parhaan tulokset saat siirtymällä suoraan näytteen lataamiseen ja ajon määrittämiseen.

## Näytteiden valmistelu sekvensointia varten

Jos tarvitset ohjeita näytekirjastojen valmistelusta sekvensointia varten, mukaan lukien kirjaston laimennus ja poolaus, lue käyttöohjeiden osio kirjaston valmistelusarjasta.

Näytekirjastojen laimennus riippuu oligonukleotidipoolien monimutkaisuudesta. Klusteritiheyden optimointi MiSeqDx-laitteessa on tarpeen, ja optimaalinen klusteritiheys vaihtelee tietyn kirjaston valmistelumäärityksen mukaan.

## Näytekirjastojen lataaminen kasettiin

Kun reagenssikasetti on täysin sulanut ja käyttövalmis, olet valmis lataamaan näytteet kasettiin.

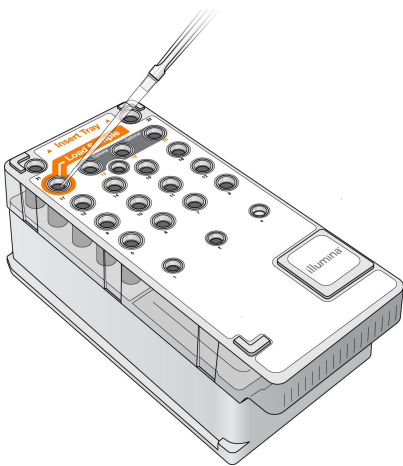


1. Käytä erillistä, puhdasta ja tyhjää 1 ml:n pipettikärkeä kalvosulun puhkaisemiseen **Load Samples** (Latausnäytteet) -merkinnällä varustetun reagenssikasetin säiliön kohdalla.

**HUOMAUTUS** Älä puhkaise muita reagenssiasemia. Muut reagenssiasemat puhkaistaan automaattisesti ajon aikana.

2. Pipetoi 600 µl DAL-näytekirjastoja **Load Samples** (Latausnäytteet) -säiliöön. Vältä koskemasta kalvosulkuun.
3. Tarkista säiliö ilmakuplien varalta näytteen latauksen jälkeen. Mikäli mukana on kuplia, vapauta ne taputtamalla kasettia varoen työtasoon.

Kuva 2 Kirjastojen lataaminen



4. Jatka suoraan ajon asetusvaiheisiin MiSeq-käyttöohjelmisto (MOS) -käyttöliittymän avulla.

## Ajon valmistelu

Lue täydelliset ajon asennusohjeet asiakirjasta *MiSeqDx-laitteen viiteopas MOS v4:lle (asiakirjanro 200010452)*.

1. Kirjautu sisään MiSeqDx-laitteeseen omalla Local Run Manager -ohjelmiston salasanallasi.
2. Valitse MOS-ohjelmiston aloitusnäytöstä **Sequence** (Sekvenssi).
3. Valitse ajo luettelosta ja valitse sitten **Next** (Seuraava).  
Näkyviin tulee lukuisia ajon käyttöönottonäyttöjä seuraavassa järjestyksessä: Load Flow Cell (Lataa virtauskyvetti), Load Reagents (lataa reagenssit), Review (Tarkista) ja Pre-Run Checks (Ajoa edeltävät tarkistukset).
4. Kun näkyviin tulee Load Flow Cell (Virtauskyvetin lataaminen) -näyttö, puhdista virtauskyvetti ja lataa se sitten.
5. Sulje virtauskyvetin salpa ja virtauskyvettilokeron luukku.

Sekä salpa että lokeron luukku on suljettava ennen ajon aloittamista. Kun virtauskyvetti on ladattu, ohjelmisto lukee ja kirjaa RFID-tunnisteen. Vahvistus RFID-tunnisteen onnistuneesta luennasta näkyy näytön oikeassa alakulmassa.

6. Noudata ohjelmistokehotuksia MiSeqDx SBS -liuospullon (PR2) lataamiseksi ja varmista, että jätepullo on tyhjä, sekä lataa reagenssikasetti.  
Kun MiSeqDx SBS -liuospullo (PR2) ja reagenssikasetti on ladattu, ohjelmisto lukee ja tallentaa RFID:n. Vahvistus RFID-tunnisteen onnistuneesta luennasta näkyy näytön oikeassa alakulmassa.
7. Kun ajo alkaa, sekvensointinäyttö avautuu. Tämä näyttö tarjoaa visuaalisen näytön meneillään olevasta ajosta, mukaan lukien voimakkuudet ja laatupisteetykset (Q-pisteet).

## Tulokset

Real-Time Analysis (RTA) on integroitu ohjelmisto, joka suorittaa kuva-analyysin ja emäksen tunnistamisen ja antaa laatupisteetyksen kullekin emäkselle kussakin sekvensointijaksossa. Kun ensisijainen analyysi valmistuu, MiSeqDx-laitteen kohdassa [Ajon luominen Local Run Manager -ohjelmistolla sivulla 7](#) valittu moduuli aloittaa toissijaisen analyysin. Katso määrittämisestä dokumentaatiosta muita työkujuja.

## Laadunvarmistusmenetelmät

MiSeqDx -ohjelmisto arvioi kunkin ajon, näytteen ja emäksen tunnistuksen laadunvarmistusmittareita vastaan. Tarvittaessa positiivisia ja negatiivisia kontrolleja sisältyy kirjaston valmistukseen, ja ne tulee arvioida odotetun tuloksen suhteen.

## Suorituskykyominaisuudet

Kaikki tutkimukset tehtiin MiSeqDx-laitteella.

Sukusolulinjatutkimuksissa käytettiin joko kystisen fibroosin 139-variantin MiSeqDx-määrittäystä tai TruSeq Custom Amplicon Kit Dx -sarjan Dx -reagensseja kirjaston valmisteluun. Näissä kahdessa pakkauksessa käytetään identtisiä kirjastonvalmistelureagensseja, ja niillä on vain yksi työkujuero: polymeerasiketjureaktioiden (PCR-reaktioiden) määrä (25 vs. 28). Ylimääräiset PCR-jaksot mahdollistavat pienemmän lähtö-DNA-määrän TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (50 ng) -sarjan kanssa suhteessa kystisen fibroosin 139-variantin MiSeqDx-määrittäykseen (250 ng), kuten osoitettiin lähtö-DNA:n tutkimuksessa, jossa käytettiin TruSeq Custom Amplicon Kit Dx -sarjaa. Kystisen fibroosin 139-variantin MiSeqDx-määrittäyksellä valmistellut kirjastot sekvensoitiin pakkaukseen sisältyvillä sekvensointireagensseilla. TruSeq Custom Amplicon Kit Dx -sarjan avulla valmistellut kirjastot sekvensoitiin MiSeqDx-reagenssisarja v3 -reagenssisarjalla. Myöhemmät sekvensointireagenssit ovat lisänneet tuotosta suhteessa kystisen fibroosin 139-variantin MiSeqDx-määrittäyksessä käytettyihin.

Testaus kattaa MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro -reagenssisarjan tukeman näytteidenkäsittelynopeuksien vaihteluvälin. MiSeqDx voi tukea määrityksestä riippuen 1–96 näytteen näytteidenkäsittelynopeutta ajoa kohti. MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro on suunniteltu tukemaan valittujen määritysten pienempiä näytteidenkäsittelynopeuksia tämän vaihteluvälin puitteissa.

Somaattisissa tutkimuksissa käytettiin mukautetun amplikonin TruSeq Custom Amplicon Kit Dx -sarjaa ja MiSeqDx-reagenssisarja v3-reagenssisarjaa.

Sukusolulinjan tai somaattista työkulkua seurasi analyysi sukusolulinjan varianttimoduulilla tai somaattisella varianttimoduulilla, kahta poikkeusta lukuun ottamatta. Molemmissa työkuluissa käytettiin TruSeq Custom Amplicon Kit Dx -sarjaa valmistelemaan kirjastot sekvensointia varten. Tutkimuksissa, jossa käytettiin yhtä geeniä (sukusolulinjan suorituskyky; kystisen fibroosin 139-variantin MiSeqDx-määritys) tai kahta geeniä (somaattinen suorituskyky) edustavina mutaatiopaneeleina, käytettiin määrityskohtaisia työkulkuja ja analyysimoduuleja.

**HUOMAUTUS** Amplikonin genomisisältö on esitetty yhteenvetona suhteessa sekvensoituun genomijuosteeseen. Miinusjuosteen perusteella suunnitelluissa amplikoneissa vertailugenomisisältö on käänteinen osa (esimerkiksi PolyA-alueet miinusjuosteen amplikoneissa vastaavat vertailugenomin PolyT-alueita).

## Suorituskykyominaisuuksissa käytettyjen laskelmien määritelmät

- Positiivinen yhtäpitävyysprosentti (PPA) lasketaan osuutena sijainneista, jotka on luokiteltu varianteiksi viitemenetelmällä ja jotka määritys oikeaoppisesti ilmoittaa.
  - (määrityksen oikeaoppisesti ilmoittamien varianttilokusten määrä) / (varianttilokusten kokonaismäärä)  
Varianttisijainnit, jotka määritys ilmoittaa ja jotka ovat yhteneviä viitemenetelmän kanssa, ovat oikeita positiivisia (TP). Varianttisijainnit, jotka määritys ilmoittaa viitetunnistuksiksi tai erilaisiksi varianttitunnistuksiksi, ovat vääriä negatiivisia (FN).
- Negatiivinen yhtäpitävyysprosentti (NPA) lasketaan osuutena sijainneista, jotka on luokiteltu wild-tyyppisiksi viitemenetelmällä ja jotka määritys oikeaoppisesti ilmoittaa.
  - (määrityksen oikeaoppisesti ilmoittamien villityyppisten sijaintien luku) / (villityyppisten sijaintien kokonaisluku)  
Villityyppiset sijainnit, jotka määritys ilmoittaa ja jotka ovat yhteneviä viitemenetelmän kanssa, ovat oikeita negatiivisia (TN). Villityyppilokukset, jotka määritys ilmoittaa variantteina, ovat vääriä positiivisia (FP).
- Yleinen yhtäpitävyysprosentti (OPA) lasketaan osuutena sijainneista, jotka määritys on oikeaoppisesti ilmoittanut suhteessa viitemenetelmään.

- ([määrityksen oikeaoppisesti ilmoittama varianttien sijaintien luku] + [määrityksen oikeaoppisesti ilmoittama wild-tyyppisten sijaintien luku]) / ([varianttien sijaintien luku yhteensä] + [wild-tyyppisten sijaintien luku yhteensä])
- Variantin tunnistussovelluksia varten PPA:n, NPA:n ja OPA:n laskelmat eivät sisällä ei-tunnistuksia (variantin tai viitteen sijainteja, jotka eivät täytä yhtä tai useampaa laatusuodatinta). Kaksi tutkimusta ei sisällä ei-tunnistettuja oikeiden tunnistusten prosenttisuudessa ja tämä ei-tunnistusten pois jäänti on ilmoitettu asianomaisissa taulukoissa.
- Tunnistusaste lasketaan suodattimet läpäisevien sijaintien kokonaislukuna, joka jaetaan kromosomeille 1–22 sekvensoitujen paikkojen yhteismäärällä. X- ja Y-kromosomit jätetään pois. Tämä mittari ei ota huomioon tunnistusten yhteneväisyyttä viitemenetelmän kanssa.

Analyysiä edeltäviin tekijöihin (esim. eristysmenetelmiin tai lähtö-DNA:han) liittyvät suorituskykyominaisuudet on kuvattu sovellettavan kirjastonvalmistelumenetelmän pakkausselosteessa.

## Näytteen indeksointi

Kirjaston valmistelun aikana lisätyt näytteen indeksialukkeet määrittävät yksilöllisen sekvenssin kullekin näyte-DNA:lle, minkä avulla on mahdollista yhdistää useita näytteitä yhdeksi sekvensointiajoksi. Näytteen indeksoiminen on testattu sekä iturata- että somaattisten työnkulkujen osalta.

Yhteensä 96 näyteindeksiä testattiin edustavalla määrityksellä, joka on suunniteltu suorittamaan haku eri geeneille kattaen 12 588 emästä juostetta kohti kaikissa 23 ihmiskromosomissa sen varmistamiseksi, voiko määrittäminen tehdä genotyyppisen tunnistuksen yhdenmukaisesti annetun näytteen kohdalla eri indeksialukeyhdistelmissä. Y-kromosomi ei sisällä luottamusalueita, ja sitä ei arvioitu. Kahdeksaa yksilöllistä näytettä testattiin 12 eri indeksialukeyhdistelmällä näytettä kohti. Sukusolulinjan analyysimoduulilla saatuja näytetuloksia vertailtiin Platinum Geomesin versioon 2016-01. PPA (SNV:t ja indelit) ylitti 97 % (todelliset positiiviset tunnistukset olivat ainakin 70 SNV:iden osalta, 38 insertioiden osalta, 36 deleetioiden osalta) ja NPA oli 100 % (vähintään 23 440 viiteasemaa indeksiyhdistelmää kohden) kunkin 96 indeksiyhdistelmän osalta. Yksittäinen indeksi testattiin erikseen sen tarkistamiseksi, että MiSeqDx-reagenssarja v3 -sarjan v3 sekvensointikemia pystyy tukemaan alle kahdeksaa näytettä (MiSeqDx Universal Kit 1.0 -sarjan edeltävä kemia oli rajattu vähintään kahdeksaan näytteeseen). Yksittäisen indeksin PPA-arvot olivat 98,9 % (180/182) SNV:iden osalta, 100 % (38/38) insertioiden osalta ja 100 % (46/46) deleetioiden osalta. NPA oli 100 % (23 856/23 856).

Näytteen 12 replikaattia (24 kirjastoa) testattiin indeksin tarkkuuden mittaamiseksi somaattisten varianttien avulla tiheyksillä 0,05–0,10 käyttämällä somaattista varianttimoduulia (kaksi indeksiyhdistelmää per replikaatti käytettiin somaattisten tunnistusten tekemiseen). PPA oli 100 % SNV:iden (64/64), insertioiden (11/11) ja deleetioiden (19/19) osalta. NPA oli 100 % (vähintään 11 590 viiteasemaa indeksiyhdistelmää kohden) kaikkien indeksiyhdistelmien osalta.

## Näytteen siirto

MiSeqDx-laitteen työnkulku sisältää kirjaston valmistelun ja useiden näytteiden plus kontrollien sekvensoinnin, kaikki käsiteltyinä yhdellä kerralla. Näytteesiirtymistutkimuksella arvioitiin, vaikuttavatko testituloksiin virheelliset positiiviset tulokset, jotka johtuivat kuoppien välisen kontaminaation aiheuttamasta siirtymisestä näytekirjaston valmistelun aikana sekä ajojen välisestä kontaminaatiosta peräkkäisten sekvensointiajojen aikana. Somaattisia variantteja käytettiin, koska ne voidaan havaita pienemmillä alleelitiheystasoilla kuin sukusolulinjavarientit.

Näytteet koostuivat solulinjoista saaduista neljästä genomisesta DNA-näytteestä, ja niissä kussakin oli eri paneelimutaatiot kahden geenin edustavassa määrityksessä. Näytteet olivat sellaisia, että yhden aseman mutaatiolla on muissa vertailusekvenssi (villityyppi).

Kuoppien välinen siirtyminen on määritetty virhetilaksi, jonka mahdollisesti aiheuttavat manuaaliset käsittelyvaiheet (pipetointi, näytteiden sekoittuminen jne.). Jotta voitiin arvioida siirtyminen yhdestä näytekuopasta toiseen, tehtiin kaksi testiajoa:

- shakkilauta-asettelu korkean genomisen lähtö-DNA:n (gDNA) näytteestä, jossa oli mutaatio geenissä 1 vuorotellen geenin 2 mutaation sisältävän matalan lähtö-gDNA:n kanssa.
- shakkilauta-asettelu korkean genomisen lähtö-DNA:n (gDNA) näytteestä, jossa oli mutaatio geenissä 2 vuorotellen geenin 1 mutaation sisältävän matalan lähtö-gDNA:n kanssa.

Kussakin ajossa yhteensä 12 replikaattia arvioitiin virheellisten positiivisten tunnistusten varalta (esim. geenin 1 mutaatio raportoituna kuopassa, joka oli määritetty geenin 2 mutaationäytteeksi, tai toisin päin).

Ajojen väliseksi siirtymäksi määritetään vikatila, jonka mahdollisesti synnyttää jäämä aiemmasta sekvensointiajosta. Jotta voitiin määrittää, onko sekvensointiajojen välillä siirtymää, valmisteltiin kaksi levyä, jossa kussakin oli 11 rinnakkaisnäytettä yksittäisestä korkean lähtö-gDNA:n näytteestä ja tyhjä näyte, ja ne sekvensoitiin peräkkäin yhdellä MiSeqDx-laitteella ja arvioitiin virheellisten positiivisten tunnistusten varalta. Ensimmäinen ajo sisälsi 11 replikaattia geenin 2 mutaationäytteestä plus yhden tyhjän. Toinen ajo sisälsi 11 replikaattia geenin 1 mutaationäytteestä plus yhden tyhjän. Geenin 2 mutaationäytekirjasto sekvensoitiin ensin ja sen jälkeen tehtiin sekvensointiajo geenin 1 mutaationäytekirjastolla, minkä jälkeen tehtiin toinen toistettu geenin 2 mutaationäytekirjaston sekvensointiajo. Jos geenin 2 mutaatioita havaitaan vain geenin 1 mutaatioita sisältävässä ajossa tai päinvastoin, se olisi merkki siirtymästä.

*Kuoppien välisen* siirtymän aiheuttamia virheellisiä positiivisia tunnistuksia raportoitiin nolla (0/24, 0 %). Kaikki odotetut mutaatiot tunnistettiin. *Ajojen välisen* siirtymän aiheuttamia virheellisiä positiivisia tunnistuksia raportoitiin nolla (0/24, 0 %). Kaikki odotetut mutaatiot tunnistettiin. *Kokonaissiirtymän* aiheuttamia virheellisiä positiivisia tunnistuksia raportoitiin nolla (0/48, 0 %).

# Sukusolulinjan suorituskykyominaisuudet

Tässä kuvatuissa tutkimuksissa käytettiin sukusolulinjan varianttimoduulia analysoimaan sekvensointitiedot, lukuun ottamatta tutkimuksia, joissa yhden geenin paneelissa käytettiin määrittämismoduulia.

## Tarkkuus

Seuraava tutkimus toteutettiin MiSeqDx-laitteen tarkkuuden arvioimiseksi MiSeqDx-reagenssarja v3 -reagenssarjalla ja korkealaatuisella DNA:lla. Tutkimuksessa käytettiin edustavaa määritystä, joka on suunniteltu suorittamaan haku eri geeneistä ja 12 588 emäksestä 23 eri kromosomissa 150 amplikonin avulla. Y-kromosomi ei sisällä luottamusalueita, ja sitä ei arvioitu. Tässä tutkimuksessa käytetyt 12 yksilöllistä näytettä ovat yksittäisestä perheestä – kahdelta vanhemmalta ja 10 lapselta – ja ne on usein sekvensoitu useissa laboratorioissa ja useilla sekvensointimenetelmillä. Näytteistä viisi on naisilta ja seitsemän miehiltä. Jokainen näyte testattiin duplikaattina. Tarkkuus määritettiin SNV:iden, insertioiden ja deleetioiden osalta vertaamalla tutkimustietoja hyvin luokiteltuun vertailutietokantaan. Vertailutietokannan sekvenssi (Platinum Genomes -versio 2016-01) oli peräisin useiden sekvensointimenetelmien, julkisesti saatavilla olevien tietojen ja perinnöllisten tietojen yhdistelmästä. Luottamukselliset genomialueet määritettiin tämän viitemenetelmän mukaisesti, ellei toisin määritetty. Näytteet ajettiin yhteensä kahdeksan kertaa. Esitetyt taulukot osoittavat tarkkuuden perustuvan ensimmäisen ajon tietoihin.

**Taulukko 1** sisältää tutkimustiedot, joissa on positiivinen ja negatiivinen prosenttiyhenteisyys näytekohtaisesti ja joissa varianttituloksia verrataan hyvin karakterisoituun yhdistelmäviitemenetelmään PPA:n laskelmia varten. Kolme varianttityyppiä (SNV:t, insertiot ja deleetiot) yhdistetään. Koska viitemenetelmä tarjoaa tulokset vain yhden nukleotidin varianteille ja insertioille/deleetioille, ei-varianttien emäksen tuloksia verrataan ihmisgenomin viitesekvenssiin hg19 NPA:n laskelmia varten.

Taulukko 1 MiSeqDx-laitteen emäksen tunnistustulosten yhtäpitävyys näytteittäin

Näyte	Keskimääräinen tunnistusaste	Varianteja yhteensä	TP-variantteja yhteensä	FN-variantteja yhteensä	Tunnistamatta jääneet	TN-tunnistukset yhteensä	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	152	152	0	4	24 024	100	100	100
NA12878	> 99,9	270	266	0	4	23 856	100	100	100
NA12879	> 99,9	192	190	1	1	24 054	99,5	100	> 99,9
NA12880	> 99,9	222	220	0	6	24 052	100	100	100
NA12881	> 99,9	250	247	1	2	23 862	99,6	100	> 99,9

Näyte	Keskimääräinen tunnistusaste	Variantteja yhteensä	TP-variantteja yhteensä	FN-variantteja yhteensä	Tunnistamatta jääneet	TN-tunnistukset yhteensä	PPA	NPA	OPA
NA12882	> 99,9	200	196	2	2	23 962	99,0	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	226	224	0	6	23 870	100	100	100
NA12884	> 99,9	228	226	1	1	23 942	99,6	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	244	240	2	2	23 942	99,2	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	230	228	1	1	23 888	99,6	100	> 99,9
NA12888	> 99,9	216	216	0	4	24 002	100	100	100
NA12893	> 99,9	236	234	0	2	23 810	100	100	100

Edustava määritys koostui 150 amplikonista, jotka kattoivat erilaista genomisisältöä. Amplikonien GC-sisältö vaihteli välillä 26–87 %. Amplikoneilla oli lisäksi joukko yksittäisen nukleotidin (esim. PolyA, PolyT), dinukleotiden ja trinukleotidin toistoja. Tiedot koottiin amplikonikohtaisesti (Taulukko 2), jotta voitiin määrittää genomisen sisällön vaikutus oikeiden tunnistusten prosenttiosuuteen. Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus koostuu variantti- ja vertailutunnistuksista ja on alle 100 %, jos tunnistukset ovat virheellisiä tai tunnistuksia ei ole. Tunnistuksia ei ole, kun yksi tai useampi suodatin ei täyttynyt variantin tunnistuksen osalta (esim. riittämätön kattavuus).

Taulukko 2 kahdeksasta FN-variantista seitsemän ilmeni yhden emäsparin insertin yhteydessä amplikonissa 111, joka sisältää myös PolyA-homopolymeerin ja GC-sisältöä 0,29. Jäljelle jäänyt 1 FN (virheellinen tunnistus) johtui odotetusta heterotsygoottisesta SNV:stä amplikonissa 125, jossa GC-sisältö oli 0,68, mitä kutsuttiin homotsygoottiseksi variantiksi. SNV-variantin esiintymistiheys oli 0,71, mikä on homotsygoottisen variantin luokittelukynnyksen 0,70 yläpuolella. Amplikoni, jossa oli pieni prosenttiosuus oikeita tunnistuksia (98,2 %), oli amplikoni 17, jossa oli 40 puuttuvaa tunnistusta ja AT-toistoja ja GC-sisältöä 27 %.

Taulukko 2 MiSeqDx-laitteen amplikonitason tarkkuus

Amplikoni	Kromosomi	Amplikonin alkupää	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus
1	1	36450499	36450591	93	93	Indeli	0,22	2232	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indeli	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indeli	0,4	2184	0	0	100

Amplikoni	Kromosomi	Amplikonin alkuperä	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisäily	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus
4	1	223906657	223906748	92	92	Indeli	0,49	2208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indeli	0,39	1680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA (3), indeli	0,27	2112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indeli	0,28	2160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indeli	0,38	1920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Ei sovelleta	0,65	1944	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	2112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indeli	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indeli	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Ei sovelleta	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indeli	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indeli	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Ei sovelleta	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indeli	0,49	1680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	2112	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indeli	0,57	1774	0	2	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1872	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	2328	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Ei sovelleta	0,29	1872	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indeli	0,36	1488	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1656	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indeli	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Ei sovelleta	0,78	1800	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	2016	0	0	100



Amplikoni	Kromosomi	Amplikonin alkuperä	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisäilytys	GC-säilytys	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus
30	5	41069808	41069871	64	64	Ei sovelleta	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indeli	0,3	1992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1608	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	2184	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indeli	0,43	1800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	10	10	PolyG (6)	0,68	2448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indeli	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indeli	0,61	2244	0	12	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	2352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indeli	0,53	2280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	2064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indeli	0,61	2256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	2184	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Ei sovelleta	0,44	1752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indeli	0,35	2112	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	2088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indeli	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indeli	0,62	2160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indeli	0,71	2184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Ei sovelleta	0,31	1584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indeli	0,35	2232	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Ei sovelleta	0,42	1992	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indeli	0,61	2113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	Indeli	0,3	1608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	2352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indeli	0,32	1560	0	0	100

Amplikoni	Kromosomi	Amplikonin alku	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus
56	9	107620823	107620918	96	96	Ei sovelleta	0,49	2304	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1992	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indeli	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indeli	0,47	1872	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	2184	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1896	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	2160	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indeli	0,35	2280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indeli	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Ei sovelleta	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Ei sovelleta	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Ei sovelleta	0,45	2304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indeli	0,46	1680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Ei sovelleta	0,65	2400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indeli	0,37	1488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Ei sovelleta	0,59	2448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Ei sovelleta	0,42	2040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	2184	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indeli	0,53	2040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), indeli	0,34	2040	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	2040	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indeli	0,52	2016	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	2232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Ei sovelleta	0,49	1944	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	2280	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Ei sovelleta	0,52	1752	0	0	100

Amplikoni	Kromosomi	Amplikonin alkupää	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisäily	GC-säily	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeiden tunnistusten prosentiosuus
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indeli	0,22	2112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indeli	0,49	2136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indeli	0,39	1848	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	1608	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Ei sovelleta	0,25	1992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indeli	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Indeli	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indeli	0,35	2184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	1584	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indeli	0,62	2256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	2304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indeli	0,25	1632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indeli	0,68	2232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	2280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indeli	0,65	1704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Ei sovelleta	0,36	2184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indeli	0,56	1680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Ei sovelleta	0,27	1512	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	2280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	2088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	2496	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indeli	0,37	2184	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	2136	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indeli	0,67	2088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indeli	0,46	2184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indeli	0,26	2232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	2136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indeli (x2)	0,29	1944	7	17	98,8

Amplikoni	Kromosomi	Amplikonin alkuperä	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisäilytys	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	2184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indeli	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indeli	0,41	1887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	2064	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	2016	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1608	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Ei sovelleta	0,37	2184	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1656	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indeli	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indeli	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indeli	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Ei sovelleta	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Ei sovelleta	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Ei sovelleta	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	Ei sovelleta	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Ei sovelleta	0,61	2256	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1968	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1824	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indeli	0,46	1680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indeli	0,63	2424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indeli	0,36	1608	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	2112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indeli	0,57	2088	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indeli	0,35	1584	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	2352	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indeli	0,39	2088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), indeli	0,32	1656	0	0	100
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	2160	0	0	100

Amplikoni	Kromosomi	Amplikonin alku	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus
140	22	25750774	25750873	100	100	Indeli	0,63	2400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Ei sovelleta	0,68	2328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indeli	0,46	2328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Ei sovelleta	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indeli	0,66	2208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1656	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Ei sovelleta	0,52	1704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Ei sovelleta	0,55	0	0	0	Ei sovelleta
149	Y	2655519	2655609	91	0	Ei sovelleta	0,48	0	0	0	Ei sovelleta
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	Ei sovelleta

Ei-tunnistetuista varianteista on yhteenveto [Taulukko 3](#). Ne suodattimet, jotka aiheuttivat tunnistusten puuttumisen, on lueteltu taulukossa. Insertio amplikoniin 111 suodatettiin 9/16 tapauksessa, ja jäljelle jääneet seitsemän tapausta tunnistettiin vertailuiksi ja siten FN:iksi.

Taulukko 3 Ei-tunnistettujen varianttien yhteenveto

Amplikonin nro	Chr:Pos	Variantti	Vastaava amplikonisisältö	Suodatin	Huomaamatta jääneet variantit	Odotetut variantit	FN-tunnistukset
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42 % GC	R5x9 <sup>1</sup>	10	10	0
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29 % GC	R5x9	9	16	7

<sup>1</sup> R5x9: Toistosuodatin. Variantti on suodatettu, mikäli variantti on osittain tai kokonaan toistuvasti läsnä varianttiaseman viereisessä viitegenomissa. Vähintään yhdeksän toistoa viitteessä tarvitaan ja vain enintään viiden emäsparin toistot otetaan mukaan.

NA12878-näytteen sekvensointituloksia verrattiin NA12878:n erittäin luotettavaan genotyyppiin, jonka yhdysvaltalainen kauppaministeriön alainen virasto kansallinen standardointi- ja teknologiainstituutti (NIST) on määrittänyt (v.2.19). 150 amplikonista

92 amplikonin sisältyi kokonaan erittäin luotettaville genomialueille. 41 amplikonin oli osittain päällekkäisiä ja 17 amplikonilla ei ollut päällekkäisyyksiä NIST-sekvenssillä. Tämä tuotti 10 000 koordinaattia per vertailureplikaatti. Ei-varianttien emäksen tunnistuksia verrattiin ihmisgenomin viitesekvenssiin v. 19. Tarkkuustulokset annetaan [Taulukko 4](#).

Taulukko 4 MiSeqDx-laitteen emästen tunnistustulosten yhtäpitävyys NA12878-näytteen NIST-tietokannan kanssa

Näyte	Amplikonien lukema	Keskimääräinen tunnistusaste	TP-variantteja yhteensä	FN-variantteja yhteensä	TN-tunnistukset yhteensä	FP-tunnistukset yhteensä	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19 380	0	100	100	100

Näytteitä analysoitiin lisää pienten insertioiden ja deleetioiden (indeliin) tunnistamiseksi ([Taulukko 5](#)). Joissakin tapauksissa indeli oli yleinen kahdessa tai useammassa näytteessä, kuten Indelin sisältävät näyttereplikaatit yhteensä -sarakkeessa on mainittu. Tulokset 12 kelvollisen näytteen molemmista rinnakkaisnäytteistä on esitetty [Taulukko 5](#). Indeleitä oli yhteensä 71, ja niiden koko vaihteli välillä 1–24 emäsparia insertioissa ja 1–25 emäsparia deleetioissa. 69 indeliä havaittiin ja positiivinen yhtäpitävyysprosentti oli 100 %. Yhdellä deleetiolla (amplikoni 64, 2 bp:n deleetio (chr10 55892600 TAC>T)) ei ollut oikeita tunnistuksia, koska kukin näistä varianteista oli ei-tunnistettavissa R5x9-suodattimen vuoksi. Näin ollen PPA:ta, joka sulkee ei-tunnistetut pois, ei voitu laskea. Toisella indelillä, 1 bp:n insertio (chr17 39589692 C>CA amplikonissa 111), ei myöskään ollut oikeita tunnistuksia, koska yhdeksän varianttia oli ei-tunnistettavissa R5x9-suodattimen vuoksi ja seitsemän oli virheellisiä negatiivisia (FN) tunnistuksia.

Taulukko 5 Yhteenvedo indelin tunnistuksesta MiSeqDx-laitteella

Amplikoni	Kromosomi	Sijainti	Analysoidun fragmentin koko	Amplikonin indelin tyyppi ja pituus	Indeli	Indelin sisältäviä näyttereplikaatteja yhteensä	Ei tunnistuksia, määrä	Virheelliset indelitunnistukset	Oikeat indelitunnistukset	PPA
1	1	36450544	93	25 emäsparin deleetio	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	3 emäsparin deleetio	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	23 emäsparin insertio	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	17 emäsparin deleetio	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	5 emäsparin insertio	C>CTTAAG	10	0	0	10	100

Amplikonin Kromosomi	Sijainti	Analysoidun fragmentin koko	Amplikonin indelin tyyppi ja pituus	Indeli	Indelin sisältäviä näytetereplikaatteja yhteensä	Ei tunnistuksia, määrä	Virheelliset indelitunnistukset	Oikeat indelitunnistukset	PPA
7	1	247812083	3 emäsparin insertio	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	7 emäsparin insertio	T>TTTGGTAA	14	0	0	14	100
9	2	87003972	6 emäsparin deleetio	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	5 emäsparin insertio	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	12 emäsparin insertio	C>CTGAAAATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	2 emäsparin insertio	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	23 emäsparin deleetio	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	9 emäsparin insertio	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	1 emäsparin deleetio	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	8 emäsparin deleetio	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	11 emäsparin insertio	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	4 emäsparin deleetio	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	8 emäsparin insertio	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	21 emäsparin deleetio	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	3 emäsparin deleetio	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32986905	25 emäsparin deleetio	CTTTCACITTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	12	0	0	12	100

Amplikoni	Kromosomi	Sijainti	Analysoidun fragmentin koko	Amplikonin indelin tyyppi ja pituus	Indeli	Indelin sisältäviä näytereplikaatteja yhteensä	Ei tunnistuksia, määrä	Virheelliset indelitunnistukset	Oikeat indelitunnistukset	PPA
41	6	41647442	95	23 emäsparin deleetio	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	1 emäsparin insertio	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	4 emäsparin deleetio	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	1 emäsparin insertio	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	4 emäsparin deleetio	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156476548	93	11 emäsparin deleetio	GAATCTGCACTT>G	12	0	0	12	100
52	8	24811064	90	1 emäsparin deleetio	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	4 emäsparin insertio	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	4 emäsparin insertio	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	21 emäsparin deleetio	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	3 emäsparin deleetio	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	16 emäsparin deleetio	AGCGTCTATAACCAAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55892600	89	2 emäsparin deleetio	TAC>T	10	10	0	0	Ei sovelleta
68	11	30177690	70	2 emäsparin insertio	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59837721	62	8 emäsparin insertio	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100
75	11	118406328	85	8 emäsparin deleetio	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100



Amplikoni	Kromosomi	Sijainti	Analysoidun fragmentin koko	Amplikonin indelin tyyppi ja pituus	Indeli	Indelin sisältäviä näytereplikaatteja yhteensä	Ei tunnistuksia, määrä	Virheelliset indelitunnistukset	Oikeat indelitunnistukset	PPA
76	11	120357842	85	2 emäsparin deleetio	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	21 emäsparin insertio	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	19 emäsparin insertio	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	4 emäsparin insertio	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	20 emäsparin deleetio	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	22 emäsparin deleetio	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58050081	81	4 emäsparin insertio	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	16 emäsparin deleetio	CTTGCTCTATAAACCGT>C	10	0	0	10	100
93	14	102808554	94	5 emäsparin deleetio	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	6 emäsparin deleetio	CAAATT>C	12	0	0	12	100
96	15	77879862	95	25 emäsparin deleetio	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	3 emäsparin insertio	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	4 emäsparin insertio	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	7 emäsparin deleetio	ATTATTTTC>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	1 emäsparin deleetio	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	18 emäsparin insertio	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	10	0	0	10	100

Amplikonin Kromosomi	Sijainti	Analysoidun fragmentin koko	Amplikonin indelin tyyppi ja pituus	Indeli	Indelin sisältäviä näytetereplikaatteja yhteensä	Ei tunnistuksia, määrä	Virheelliset indelitunnistukset	Oikeat indelitunnistukset	PPA
109	17	16084985	4 emäsparin insertio	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	1 emäsparin insertio	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	24 emäsparin insertio	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	4 emäsparin deleetio	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	12 emäsparin deleetio	TTTGTATCTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38837054	22 emäsparin insertio	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	3 emäsparin insertio	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	2 emäsparin deleetio	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	15 emäsparin deleetio	TACTTGAGAACTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	5 emäsparin insertio	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50897361	11 emäsparin insertio	G>GGAATGTCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	16 emäsparin deleetio	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	11 emäsparin insertio	G>GATAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	21 emäsparin deleetio	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	5 emäsparin deleetio	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	6 emäsparin insertio	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100

Amplikoni	Kromosomi	Sijainti	Analysoidun fragmentin koko	Amplikonin indelin tyyppi ja pituus	Indeli	Indelin sisältäviä näytereplikaatteja yhteensä	Ei tunnistuksia, määrä	Virheelliset indelitunnistukset	Oikeat indelitunnistukset	PPA
142	22	37409885	97	5 emäsparin insertio	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	10 emäsparin deleetio	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

## Toistettavuus

Kahdessa tutkimuksessa arvioitiin MiSeqDx-laitteen toistettavuutta solulinjoissa (tutkimus 1 ja 2) tai leukosyyttömässä veressä, johon oli lisätty näitä solulinjoja (tutkimus 2). Tutkimuksessa 1 käytettiin useita laitteita. Tutkimuksessa 2 oli useita tutkimuspaikkoja.

## Tutkimus 1

MiSeqDx-laitteen toistettavuus määritettiin käyttämällä kahta laitetta, kahta käyttäjää ja kahta reagenssierää, yhteensä kahdeksalle ajolle. Edustava määrittäminen, näytteet ja viitemenetelmä ovat samat kuin mitä tarkkuustutkimuksessa kuvaillaan.

Tulokset on esitetty amplikonikohtaisesti kunkin laitteen osalta ([Taulukko 6](#)), jotta voidaan osoittaa tunnistusten toistettavuus eri laitteilla. Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus sisälsi sekä virheelliset tunnistukset että ei-tunnistetut (yksi tai useampi suodatin ei täyttynyt variantin tunnistuksessa). Laitteet tuottivat samanlaiset määrät ei-tunnistuksia ja virheellisiä tunnistuksia kunkin amplikonin mukaan.

Taulukko 6 Tutkimuksen laitteiden väliset toistettavuustulokset MiSeqDx-laitteelle (amplikonin tasolla)

Amplikoni	Kromosomi	Amplikonin alkupää	Amplikonin loppupää	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisäätö	GC-sisältö	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet
1	1	36450499	36450591	93	93	Indeli	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indeli	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Indeli	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Indeli	0,49	8832	0	0	8832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	7776	0	0	7776	0	0
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indeli	0,39	6720	0	0	6720	0	0

Amplikoni Kromosomi	Amplikonin alkuperä	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisäilytys	GC-sisältö	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			
							Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA (3), indeli	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Indeli	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Indeli	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	Ei sovelleta	0,65	7775	1	0	7775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	7200	0	0	7200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	8448	0	0	8448	0	0
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indeli	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indeli	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	Ei sovelleta	0,43	8928	0	0	8928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indeli	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indeli	0,27	8761	0	167	8760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	Ei sovelleta	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indeli	0,49	6720	0	0	6720	0	0
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	8448	0	0	8448	0	0
21	3	190106030	190106104	75	74	Indeli	0,57	7096	0	8	7096	0	8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	7488	0	0	7488	0	0
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	9312	0	0	9312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	Ei sovelleta	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indeli	0,36	5952	0	0	5952	0	0
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	6624	0	0	6624	0	0

Amplikoni Kromosomi	Amplikonin alkuperä	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisäisä	GC-sisältö	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			
							Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indeli	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	Ei sovelleta	0,78	7200	0	0	7200	0	0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA (3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
30	5	41069808	41069871	64	64	Ei sovelleta	0,39	6144	0	0	6144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indeli	0,3	7968	0	0	7968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	6432	0	0	6432	0	0
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
34	5	155662213	155662287	75	75	Indeli	0,43	7200	0	0	7200	0	0
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	9792	0	0	9792	0	0
36	6	24949983	24950074	92	92	Indeli	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indeli	0,61	8979	0	45	8979	0	45
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	9408	0	0	9408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indeli	0,53	9120	0	0	9120	0	0
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	8256	0	0	8256	0	0
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indeli	0,61	9024	0	0	9024	0	0
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	8736	0	0	8736	0	0
43	7	22202076	22202148	73	73	Ei sovelleta	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Indeli	0,35	8448	0	0	8448	0	0
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Indeli	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indeli	0,62	8550	0	90	8550	0	90

Amplikoni	Kromosomi	Amplikonin alku	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indeli	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	Ei sovelleta	0,31	6336	0	0	6336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	Indeli	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	Ei sovelleta	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indeli	0,61	8452	0	92	8449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	Indeli	0,3	6432	0	0	6432	0	0
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	9408	0	0	9408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Indeli	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	Ei sovelleta	0,49	9216	0	0	9216	0	0
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	7968	0	0	7968	0	0
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indeli	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indeli	0,47	7488	0	0	7488	0	0
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	8644	1	91	8644	1	91
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	7584	0	0	7584	0	0
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	8640	0	0	8640	0	0
63	10	45084159	45084253	95	95	Indeli	0,35	9120	0	0	9120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indeli	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	Ei sovelleta	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	Ei sovelleta	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	Ei sovelleta	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Indeli	0,46	6720	0	0	6720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	Ei sovelleta	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Indeli	0,37	5952	0	0	5952	0	0

Amplikonin Kromosomi	Amplikonin alkuperä	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisäisä	GC-sisältö	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			
							Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	
71	11	64418856	64418957	102	102	Ei sovelleta	0,59	9792	0	0	9792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	7008	0	0	7008	0	0
73	11	101347052	101347136	85	85	Ei sovelleta	0,42	8160	0	0	8160	0	0
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Indeli	0,53	8160	0	0	8160	0	0
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), indeli	0,34	8160	0	0	8160	0	0
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	8160	0	0	8160	0	0
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indeli	0,52	8064	0	0	8064	0	0
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	8928	0	0	8928	0	0
80	12	30881766	30881846	81	81	Ei sovelleta	0,49	7776	0	0	7776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	6816	0	0	6816	0	0
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	9117	3	0	9119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	Ei sovelleta	0,52	7008	0	0	7008	0	0
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indeli	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Indeli	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Indeli	0,39	7392	0	0	7392	0	0
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	6432	0	0	6432	0	0
88	14	39517884	39517966	83	83	Ei sovelleta	0,25	7968	0	0	7968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indeli	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Indeli	0,38	7776	0	0	7776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	Indeli	0,35	8736	0	0	8736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	6336	0	0	6336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Indeli	0,62	9024	0	0	9024	0	0

Amplikonin Kromosomi	Amplikonin alkuperä	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisäisä	GC-sisältö	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			
							Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	9216	0	0	9216	0	0
95	15	63446149	63446216	68	68	Indeli	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indeli	0,68	8928	0	0	8926	2	0
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	9120	0	0	9120	0	0
98	15	85438263	85438334	72	71	Indeli	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	Ei sovelleta	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Indeli	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	Ei sovelleta	0,27	6048	0	0	6048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	9120	0	0	9120	0	0
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	8352	0	0	8352	0	0
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	9984	0	0	9984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	PolyT (5), indeli	0,37	8736	0	0	8736	0	0
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	8544	0	0	8544	0	0
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indeli	0,67	8347	0	5	8347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	Indeli	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Indeli	0,26	8928	0	0	8928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	8544	0	0	8544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indeli (x2)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT(4), AT(4), indeli	0,26	8832	0	0	8832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	Indeli	0,41	7546	0	38	7547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	8256	0	0	8256	0	0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	6432	0	0	6432	0	0



Amplikonin Kromosomi	Amplikonin alkuperä	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisäisä	GC-sisältö	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			
							Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	
118	18	6980478	6980568	91	91	Ei sovelleta	0,37	8736	0	0	8736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	6624	0	0	6624	0	0
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indeli	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indeli	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indeli	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	Ei sovelleta	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	Ei sovelleta	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	Ei sovelleta	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	Ei sovelleta	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	Ei sovelleta	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	7296	0	0	7296	0	0
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indeli	0,46	6720	0	0	6720	0	0
131	20	25278421	25278521	101	101	Indeli	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Indeli	0,36	6432	0	0	6432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	8360	0	88	8360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Indeli	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Indeli	0,35	6336	0	0	6336	0	0
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	9408	0	0	9408	0	0
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indeli	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), indeli	0,32	6603	0	21	6601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	8640	0	0	8640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Indeli	0,63	9600	0	0	9600	0	0

Amplikonin Kromosomi	Amplikonin alkupää	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			
							Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	
141	22	32439233	32439329	97	97	Ei sovelleta	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Indeli	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	Ei sovelleta	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Indeli	0,66	8832	0	0	8832	0	0
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	6624	0	0	6624	0	0
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	6624	0	0	6624	0	0
147	X	135290777	135290847	71	71	Ei sovelleta	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	Ei sovelleta	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2655519	2655609	91	0	Ei sovelleta	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Toistettavuustutkimukset analysoitiin käyttäjäkohtaisesti käyttämällä variantin taajuutta (Taulukko 7). Tämä analyysi osoitti, että varianttitiheydet olivat yhdenmukaisia eri käyttäjien välillä. Keskimääräiset varianttitiheydet +/- 1 keskihajonta on esitetty.

Taulukko 7 Käyttäjien väliset tulokset MiSeqDx-laitteelle

Varianttitiheysalue	Yksilölliset variantit	Käyttäjän 1 analysoimat variantit yhteensä	Käyttäjän 2 analysoimat variantit yhteensä	Käyttäjän 1 raportoima keskimääräinen (SD) varianttitiheys	Käyttäjän 2 raportoima keskimääräinen (SD) varianttitiheys
Homotsygoottinen (0,70–1,00)	2424	2424	2422	0,94 +/- 0,07	0,96 +/- 0,05
Heterotsygootti (0,20–0,70)	8240	8132	8128	0,48 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

Kunkin näytteen toistettavuustutkimuksen tulokset on esitetty koottuna kaikista kahdeksasta ajosta (Taulukko 8). Kunkin varianttityypin – SNV:t, insertiot ja deleetiot – tunnistus arvioidaan erikseen. Viitesijainnit on poissuljettu. Tämä analyysi osoitti, että varianttien tulokset olivat toistettavissa näytteestä toiseen.

Taulukko 8 MiSeqDx-laitteen emäksen tunnistustulosten yhtäpitävyys näytteittäin

Näyte	SNV:t				Insertiot				Deleetiot			
	Yhteensä	TP yhteensä	FP yhteensä	FN yhteensä	Yhteensä	TP yhteensä	FP yhteensä	FN yhteensä	Yhteensä	TP yhteensä	FP yhteensä	FN yhteensä
NA12877	592	592	0	0	336	336	0	0	288	288	0	0
NA12878	1456	1456	0	0	320	304	0	0	384	368	0	0
NA12879	912	912	0	0	336	320	0	2	288	288	0	0
NA12880	1072	1071	0	1	384	384	0	0	320	304	0	0
NA12881	1248	1247	0	1	384	368	0	0	368	368	0	0
NA12882	944	943	0	1	352	336	0	4	304	288	0	0
NA12883	1088	1087	0	1	368	368	0	0	352	335	0	1
NA12884	1088	1088	0	0	400	384	0	5	336	336	0	0
NA12885	1200	1189	0	7	400	382	0	4	352	336	0	0
NA12886	1104	1102	0	2	368	352	0	3	368	368	0	0
NA12888	1056	1054	0	2	368	368	0	0	304	304	0	0
NA12893	1168	1168	0	0	352	336	0	1	368	368	0	0

Tämän toistettavuustutkimuksen kahdeksan ajon tuottamat tiedot tukevat väitettä, että MiSeqDx-laite kykenee sekvensoimaan yhdenmukaisesti:

- GC-sisällön, jota on  $\geq 19\%$  (kaikki tunnistetut emäkset 192/192 sekvensoidusta amplikonista, joissa on 19 %:n GC-sisältö, tunnistettiin oikein ei-tunnistusravolla 1,1 %)
- GC-sisällön, jota on  $\leq 78\%$  (kaikki tunnistetut emäkset 192/192 sekvensoidusta amplikonista, joissa on 78 %:n GC-sisältö, tunnistettiin oikein ilman ei-tunnistuksia)
- PolyA-pituudet  $\leq 8$  (PolyA:n 8 nukleotidin toisto tunnistettiin oikein 192/192 sekvensoidusta amplikonista, jossa oli PolyA = 8)
- PolyT-pituudet  $\leq 10$  (PolyT:n 10 nukleotidin toisto tunnistettiin oikein 192/192 sekvensoidusta amplikonista, jossa oli PolyT = 10)
- PolyG-pituudet  $\leq 7$  (PolyG:n 7 nukleotidin toisto tunnistettiin oikein 192/192 sekvensoidusta amplikonista, jossa oli PolyG = 7)
- PolyC-pituudet  $\leq 6$  (PolyC:n 6 nukleotidin toisto tunnistettiin oikein 576/576 sekvensoidusta amplikonista, jossa oli PolyC = 6)
- Dinukleotidin toistopituudet, jotka ovat  $\leq 11x$  (kaikki tunnistetut emäkset 192/192 sekvensoidusta amplikonista, joissa on 11x dinukleotidin toisto, tunnistettiin oikein 0,5 %:n ei-tunnistusten arvolla)

- Trinukleotidin toistopituudet, jotka ovat  $\leq 5x$  (kaikki tunnistetut emäkset 192/192 sekvensoidusta amplikonista, joissa on 5x trinukleotidin toisto, tunnistettiin oikein ei-tunnistusarvolla 0,5 %)
- enintään 24 emäsinsertiota ja enintään 25 emäsdeleetiota
  - 24 emäksen insertiot tunnistettu oikein 192/192 näytteessä
  - 25 emäksen deleetioidut tunnistettu oikein 223 näytteessä ja tunnistettu väärin yhdessä näytteessä 224:stä

## Tutkimus 2

Tutkimuspaikkojen välinen toistettavuustutkimus, jossa käytettiin edustavaa määritystä, Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139 Variant -määritystä, sisälsi *CFTR*:n kliinisesti merkittävien geneettisten variaatioiden alajoukon MiSeq Reporter -ohjelmistolla analysoituna. Tutkimuksessa käytettiin MiSeqDx-alustan DNA:n kohdistetun sekvensoinnin työnkulkua. Sökkoutetussa tutkimuksessa käytettiin kolmea tutkimuspaikkaa ja kahta käyttäjää kullakin tutkimuspaikalla. Kukin toimija testasi kussakin kohdassa kaksi hyvin määritettyä paneelia, joissa kussakin oli 46 näytettä, yhteensä 810 tunnistusta testipaikkaa kohti. Paneelit sisälsivät genomi-DNA:n sekoituksen solulinjoista, joissa oli tunnettuja variantteja *CFTR*-geenissä, sekä leukosyytitöntä verta, jossa oli lisätyinä solulinjoja, joilla oli tunnettuja variantteja *CFTR*-geenissä. Verinäytteet toimitettiin, jotta voitiin sisällyttää määrityksen työnkulun ensisijaisena syötteenä käytettävän gDNA:n valmistelussa käytetyt eristämismenetelmät. Näytteen läpäisyaste, joka määriteltiin laadunvarmistusmittareiden läpäisevien näytteiden määränä ensimmäisellä yrityksellä, oli 99,88 %. Kaikki testitulokset perustuvat alkutestaukseen.

Taulukko 9 Yhteenveto edustavalla MiSeqDx Cystic Fibrosis 139 Variant -määrityksellä tehdyn toistettavuustutkimuksen tuloksista

Paneeli	Näyte-numero	Näytteen genotyyppi	Vari-antit	Tunnistuksia yhteensä/ tutkimuspaikka	Positiiviset yhtäpitävät tunnistukset (variantit)			Negatiiviset yhtäpitävät tunnistukset (villityyppi)			Väärin tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä	Positiivinen yhtäpitävyys (%)	Negatiivinen yhtäpitävyys (%)	Kokonais-yhtäpitävyys (%)
					Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka					
					1	2	3	1	2	3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1G>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

Paneeli	Näyte- numero	Näytteen genotyyppi	Vari- antit	Tunnistuksia yhteensä/ tutkimuspaikka	Positiiviset yhtäpitävät tunnistukset (variantit)			Negatiiviset yhtäpitävät tunnistukset (villityyppi)			Väärin tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä	Positiivinen yhtäpitävyys (%)	Negatiivinen yhtäpitävyys (%)	Kokonais- yhtäpitävyys (%)
					Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka					
					1	2	3	1	2	3					
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9 <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 ei esiinny	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Paneeli	Näyte- numero	Näytteen genotyyppi	Vari- antit	Tunnistuksia yhteensä/ tutkimuspaikka	Positiiviset yhtäpitävät tunnistukset (variantit)			Negatiiviset yhtäpitävät tunnistukset (villityyppi)			Väärin tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä	Positiivinen yhtäpitävyys (%)	Negatiivinen yhtäpitävyys (%)	Kokonais- yhtäpitävyys (%)
					Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka					
					1	2	3	1	2	3					
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	Ei sovelleta	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	Ei sovelleta	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Ei sovelleta	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

Paneeli	Näyte- numero	Näytteen genotyyppi	Vari- antit	Tunnistuksia yhteensä/ tutkimuspaikka	Positiiviset yhtäpitävät tunnistukset (variantit)			Negatiiviset yhtäpitävät tunnistukset (villityyppi)			Väärin tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä	Positiivinen yhtäpitävyys (%)	Negatiivinen yhtäpitävyys (%)	Kokonais- yhtäpitävyys (%)
					Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka					
					1	2	3	1	2	3					
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	Ei sovelleta	100	100
B	51	F508del/2143delIT (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	Ei sovelleta	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Ei sovelleta	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	Ei sovelleta	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	Ei sovelleta	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	Ei sovelleta	100	100

Paneeli	Näyte- numero	Näytteen genotyyppi	Vari- antit	Tunnistuksia yhteensä/ tutkimuspaikka	Positiiviset yhtäpitävät tunnistukset (variantit)			Negatiiviset yhtäpitävät tunnistukset (villityyppi)			Väärin tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä	Positiivinen yhtäpitävyys (%)	Negatiivinen yhtäpitävyys (%)	Kokonais- yhtäpitävyys (%)
					Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka					
					1	2	3	1	2	3					
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Ei sovelleta	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	1812-1G>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	Ei sovelleta	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/(TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100



Paneeli	Näyte- numero	Näytteen genotyyppi	Vari- antit	Tunnistuksia yhteensä/ tutkimuspaikka	Positiiviset yhtäpitävät tunnistukset (variantit)			Negatiiviset yhtäpitävät tunnistukset (villityyppi)			Väärin tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä	Positiivinen yhtäpitävyys (%)	Negatiivinen yhtäpitävyys (%)	Kokonais- yhtäpitävyys (%)
					Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka	Testi- paikka					
					1	2	3	1	2	3					
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	Ei sovelleta	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
Yhteensä				74 556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

<sup>1</sup> Yhdessä replikaatissa N1303K-varianttia vastaava villityypin sijainti tuotti ei-tunnistuksen riittämättömän kattavuuden vuoksi.

<sup>2</sup> Yhdellä replikaatilla näytteistä 5 ja 75 oli 0 %:n tunnistusaste. Lisätutkimukset osoittavat, että näytteitä ei ehkä ole lisätty näytelevyyn ennen kirjaston valmistelua, koska putkiin jääneet näytemäärät olivat yhdenmukaisia sen oletuksen kanssa, että mitään määrää ei ollut poistettu.

<sup>3</sup> Todisteet osoittavat, että toimija vaihtoi todennäköisesti näytteet 9 ja 10 ennen kirjaston valmistelua.

<sup>4</sup> Kahden näytteen yhden replikaatin M1V-varianttia vastaava villityypin sijainti aiheutti tunnistuksen epäonnistumisen riittämättömän kattavuuden vuoksi.

## Somaattisen suorituskyvyn ominaisuudet

Tässä kuvatuissa tutkimuksissa käytettiin somaattista varianttimoduulia analysoimaan sekvensointitiedot, lukuun ottamatta tutkimuksia, joissa kahden geenin paneelissa käytettiin määrityskohtaista moduulia.

### Tarkkuus

MiSeqDx-laitteen tarkkuutta arvioitiin FFPE-näytteistä eristetyllä DNA:lla kolmessa tutkimuksessa.

## Tutkimus 1

Tutkimuksessa käytettiin edustavaa määritystä, joka on suunniteltu suorittamaan haku eri geeneistä ja 12 588 emäksestä 23 eri kromosomissa 150 ampikonin avulla. Y-kromosomi ei sisällä luottamusalueita, ja sitä ei arvioitu. Tässä tutkimuksessa käytetyt viisi yksilöllistä näytettä ovat yksittäisestä perheestä – kahdelta vanhemmalta ja kolmelta lapselta – ja ne on usein sekvensoitu useissa laboratorioissa ja useilla sekvensointimenetelmillä. Näytteistä kolme on naisilta ja kaksi miehiltä. Kaikki näytteet olivat formaliiniin kiinnitettyjä ja parafiiniin upotettuja, ennen kuin DNA eristettiin tutkimusta varten. Näyte GM12877 laimennettiin DNA:n tasolla näytteellä GM12878, jotta saatiin GM12877-D ja voitiin muodostaa varianttijoukko, jonka tiheydet olivat lähellä 5 %:a ja 10 %:a. Jokainen näyte testattiin duplikaattina, lukuun ottamatta näytettä GM12877-D, joka testattiin viitenä replikaattina. Tarkkuus määritettiin SNV:iden, insertioiden ja deleetioiden osalta vertaamalla tutkimustietoja hyvin luokiteltuun vertailutietokantaan. Vertailutietokannan sekvenssi (Platinum Genomes -versio 2016-01) oli peräisin useiden sekvensointimenetelmien, julkisesti saatavilla olevien tietojen ja perinnöllisten tietojen yhdistelmästä. Luottamukselliset genomialueet määritettiin tämän viitemenetelmän mukaisesti, ellei toisin määritetty. Näytteet ajettiin yhteensä kahdeksan kertaa. Esitetyt taulukot osoittavat tarkkuuden perustuvan ensimmäisen ajon tietoihin.

**Taulukko 10** sisältää tutkimustiedot, joissa on positiivinen ja negatiivinen prosenttiyhteneväisyys näytekohtaisesti ja joissa varianttituloksia verrataan hyvin karakterisoituun yhdistelmäviitemenetelmään PPA:n laskelmia varten. Kolme varianttityyppiä (SNV:t, insertiot ja deleetiot) yhdistetään. Koska viitemenetelmä tarjoaa tulokset vain yhden nukleotidin varianteille ja insertioille/deleetioille, ei-varianttien emäksen tuloksia verrataan ihmisgenomin viitesekvenssiin hg19 NPA:n laskelmia varten.

**Taulukko 10** MiSeqDx-laitteen emäksen tunnistustulosten yhtäpitävyys kuuden hyvin luokitellun näytteen vertailutietojen kanssa

Näyte	Keskimääräinen tunnistusaste	Varianteja yhteensä	TP-variantteja yhteensä	FN-variantteja yhteensä	TN-tunnistukset yhteensä	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	152	147	0	23 719	100	100	100
GM12878	98,4	270	260	0	23 482	100	100	100
GM12879	98,7	192	186	0	23 744	100	100	100
GM12885	99,1	244	236	0	23 713	100	100	100
GM12886	98,7	230	226	0	23 652	100	100	100
GM12877-D <sup>1</sup>		675	650	0		100	100	100
GM12877-D <sup>2</sup>	98,4	155	155	0	57 608	100	100	100

<sup>1</sup> Variantit, joiden esiintymistiheys on yli 20 %.

<sup>2</sup> Variantti, jonka esiintymistiheys on alle 20 %.

Suunniteltiin 150 amplikonin eri genomisisältöjen kattamiseksi. Amplikonien GC-sisältö vaihteli välillä 26–87 %. Amplikoneilla oli lisäksi joukko yksittäisen nukleotidin (esim. PolyA, PolyT), dinukleotidin ja trinukleotidin toistoja. Määrityksessä käytettiin kuutta uniikkia näytettä. Tiedot koottiin amplikonikohtaisesti (Taulukko 11), jotta voitiin määrittää genomisen sisällön vaikutus oikeiden tunnistusten prosenttiosuuteen. Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus koostuu variantti- ja vertailutunnistuksista ja on alle 100 %, jos tunnistukset ovat virheellisiä tai tunnistuksia ei ole. Tunnistuksia ei ole, kun yksi tai useampi suodatin ei täyttynyt variantin tunnistuksen osalta (esim. riittämätön kattavuus). Virheellisiä tunnistuksia ei ollut. Ei-tunnistettujen lukumäärä vaihteli merkittävästi amplikonista toiseen. GC-sisältö ja useat vuorovaikutukset GC-sisällön kanssa olivat merkittävimmät ei-tunnistusten ennustajat. 2040/2580 (79 %) ei-tunnistetuista johtui kattavuusmäärityksen täyttymättä jäämisestä. Amplikonit, joissa oli GC-sisältöä enemmän kuin 78 %, aiheuttivat eniten ei-tunnistuksia. Edustavassa amplikonissa, jossa oli 78 % GC-sisältöä, oli yhteensä 675 tunnistamatonta. Edustavassa amplikonissa, jossa oli 87 %, oli yhteensä 1365 tunnistamatonta. Kattavuutta voidaan lisätä pienentämällä virtauskyvettiin lisättyjen näytteiden määrää, mikä voi mahdollistaa suuremman GC-sisällön amplikonien tunnistuksen.

Taulukko 11 Amplikonitason tarkkuustiedot

Amplikoni	Kromosomi	Amplikonin alku	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus
1	1	36450499	36450591	93	93	Indeli	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indeli	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indeli	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Indeli	0,49	1380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1215	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indeli	0,39	1050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), indeli	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indeli	0,28	1350	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indeli	0,38	1200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Ei sovelleta	0,65	1215	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1117	0	10	99,1
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	1320	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indeli	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indeli	0,3	1365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Ei sovelleta	0,43	1395	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indeli	0,42	1095	0	0	100

Amplikoni	Kromosomi	Amplikonin alku	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indeli	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	Ei sovelleta	0,43	1245	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indeli	0,49	1050	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	1305	0	30	97,8
21	3	190106030	190106104	75	74	Indeli	0,57	1108	0	2	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1170	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	1455	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Ei sovelleta	0,29	1169	0	1	99,9
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indeli	0,36	930	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1035	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indeli	0,27	920	0	10	98,9
28	5	1882081	1882158	78	75	Ei sovelleta	0,78	450	0	675	40,0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	1260	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	Ei sovelleta	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indeli	0,3	1245	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1005	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	1365	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indeli	0,43	1125	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	1530	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indeli	0,63	1380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indeli	0,61	1383	0	27	98,1
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	1455	0	15	99,0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indeli	0,53	1425	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	1290	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indeli	0,61	1410	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	1365	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Ei sovelleta	0,44	1095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indeli	0,35	1320	0	0	100

Amplikoni	Kromosomi	Amplikonin alku	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC- sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	1299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indeli	0,38	1275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indeli	0,62	1350	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indeli	0,71	1365	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Ei sovelleta	0,31	990	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indeli	0,35	1395	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Ei sovelleta	0,42	1245	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indeli	0,61	1305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	Indeli	0,3	1005	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	1470	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indeli	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	Ei sovelleta	0,49	1440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indeli	0,68	1455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indeli	0,47	1170	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	0	0	1365	0
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1185	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	1350	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indeli	0,35	1425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indeli	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	Ei sovelleta	0,49	1200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Ei sovelleta	0,51	1215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Ei sovelleta	0,45	1440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indeli	0,46	1050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Ei sovelleta	0,65	1500	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indeli	0,37	930	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Ei sovelleta	0,59	1530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1095	0	0	100

Amplikoni	Kromosomi	Amplikonin alku	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus
73	11	101347052	101347136	85	85	Ei sovelleta	0,42	1275	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	1365	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indeli	0,53	1275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), indeli	0,34	1275	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	1275	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indeli	0,52	1260	0	14	98,9
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	1395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Ei sovelleta	0,49	1215	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1065	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	1425	0	0	100
83	12	24167504	24167576	73	73	Ei sovelleta	0,52	1095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indeli	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Indeli	0,49	1335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indeli	0,39	1155	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	1005	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Ei sovelleta	0,25	1245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indeli	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Indeli	0,38	1215	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indeli	0,35	1365	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	975	0	60	94,2
93	14	102808496	102808589	94	94	Indeli	0,62	1410	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	1440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indeli	0,25	1020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indeli	0,68	1395	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	1425	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indeli	0,65	1065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Ei sovelleta	0,36	1365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indeli	0,56	1050	0	0	100

Amplikoni	Kromosomi	Amplikonin alku	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC- sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus
101	16	1894910	1894972	63	63	Ei sovelleta	0,27	945	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	1425	0	0	100
103	16	3682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	1305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	1560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indeli	0,37	1362	0	3	99,8
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	1335	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indeli	0,67	1303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Indeli	0,46	1365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indeli	0,26	1395	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	1335	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indeli (x2)	0,29	1215	0	78	94,0
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	1365	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indeli	0,26	1365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Indeli	0,41	1175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	1289	0	1	99,9
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	1260	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1005	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Ei sovelleta	0,37	1365	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indeli	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indeli	0,47	1215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indeli	0,45	1275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Ei sovelleta	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Ei sovelleta	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	Ei sovelleta	0,68	1110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Ei sovelleta	0,64	1050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Ei sovelleta	0,61	1410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1230	0	0	100

Amplikoni	Kromosomi	Amplikonin alku	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indeli	0,46	1050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indeli	0,63	1515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indeli	0,36	1005	0	6	99,4
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	1320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indeli	0,57	1305	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indeli	0,35	990	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	1470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indeli	0,39	1305	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), indeli	0,32	1029	0	7	99,3
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	1350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indeli	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	Ei sovelleta	0,68	1455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indeli	0,46	1455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Ei sovelleta	0,6	1485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indeli	0,66	1380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1035	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Ei sovelleta	0,52	1065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Ei sovelleta	0,55	0	0	0	Ei sovelleta
149	Y	2655519	2655609	91	0	Ei sovelleta	0,48	0	0	0	Ei sovelleta
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	Ei sovelleta

Ei-tunnistetuista varianteista on yhteenveto [Taulukko 12](#). Ne suodattimet, jotka aiheuttivat tunnistusten puuttumisen, on lueteltu taulukossa.

Taulukko 12 Ei-tunnistettujen varianttien yhteenveto

Amplikonin nro	Chr.Pos	Variantti	Vastaava amplikonisisältö	Suodatin	Huomaamatta jääneet variantit	Odotetut variantit
28	5:1882129	T > G	78 % GC	LowDP <sup>1</sup>	8	13



Amplikonin nro	Chr.Pos	Variantti	Vastaava amplikonisisältö	Suodatin	Huomaamatta jääneet variantit	Odotetut variantit
52	8:24811064	AG > A	PolyG (7), CTC(4), 61 % GC	R3x6 <sup>2</sup>	15	15
60	10:11784633	C > T	PolyGC (3), 87 % GC	LowDP	13	13
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42 % GC	R3x6	9	9
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29 % GC	R3x6	13	13

<sup>1</sup> LowDP: Vähäinen kattavuus. Variantti on suodatettu, jos syvyys ainakin yhdessä poolissa tässä tietyssä asemassa on alle 900.

<sup>2</sup> R3x6: Toistosuodatin. Variantti on suodatettu, mikäli variantti on osittain tai kokonaan toistuvasti läsnä varianttiaseman viereisessä viitegenomissa. Vähintään 6 toistoa viitteessä tarvitaan ja vain enintään 3 emäsparin toistot otetaan mukaan.

Näytteen sekvensointituloksia verrattiin erittäin luotettavaan NA12878-genotyyppiin, jonka oli määrittänyt National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). 150 amplikonista 92 amplikonista sisältyi kokonaan erittäin luotettaville genomialueille. 41 amplikonista oli osittain päällekkäisiä ja 17 amplikonilla ei ollut päällekkäisyyksiä NIST-sekvenssillä. Tämä tuotti 10 000 koordinaattia per vertailureplikaatti. Ei-varianttien emäksen tunnistuksia verrattiin luotuun ihmisgenomin viitesekvenssiin hg19. Tarkkuustulokset annetaan [Taulukko 13](#).

Taulukko 13 MiSeqDx-laitteen emäksen tunnistustulosten yhtäpitävyys GM12878-näytteen NIST-viitteen kanssa

Näyte	Amplikonien lukema	Keskimääräinen tunnistusaste	TP-varianttien tunnistuksia yhteensä	FN-varianttien tunnistuksia yhteensä	TN-tunnistukset yhteensä	FP-tunnistukset yhteensä	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19231	0	100	100	100

Viittä laimentamatonta näytettä analysoitiin lisää pienten insertioiden ja deleetioiden (indelien) tunnistamiseksi ([Taulukko 14](#)). Joissakin tapauksissa indeli oli yleinen kahdessa tai useammassa näytteessä, kuten Indelin sisältävät näyttereplikaatit yhteensä -sarakeessa on mainittu. Tulokset viiden näytteen molemmista rinnakkaisnäytteistä on esitetty [Taulukko 14](#). Indeleitä oli yhteensä 71, ja niiden koko vaihteli välillä 1–24 emäsparia insertioissa ja 1–25 emäsparia deleetioissa. 68 indeliä havaittiin ja positiivinen yhtäpitävyys oli 1. Kolmella insertiolla ja deleetiolla ei ollut oikeita tunnistuksia, koska kukin näistä varianteista oli ei-tunnistettavissa R3x6-suodattimen vuoksi. Siksi PPA:ta, joka sulkee pois ei-tunnistetut, ei voitu laskea. Nämä kolme varianttia olivat 1 emäsparin deleetio (chr8 24811064 AG>A); kahden emäsparin deleetio (chr10 55892600 TAC>T) ja 1 emäsparin insertio (chr17 39589692 C>CA).

Taulukko 14 Yhteenveto indelin tunnistuksesta MiSeqDx-laitteella

Amplikoni	Kromosomi	Sijainti	Analysoidun fragmentin koko	Amplikonin indelin tyyppi ja pituus	Indeli	Indelin sisältäviä näyttereplikaatteja yhteensä	Ei tunnistuksia, määrä	Virheelliset indelitunnistukset	Oikeat indelitunnistukset	PPA
1	1	36450544	93	25 emäsparin deleetio	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	7	0	0	7	100

Amplikonin Kromosomi	Sijainti	Analysoidun fragmentin koko	Amplikonin indelin tyyppi ja pituus	Indeli	Indelin sisältäviä näytereplikaatteja yhteensä	Ei tunnistuksia, määrä	Virheelliset indelitunnistukset	Oikeat indelitunnistukset	PPA
2	1	109465165	3 emäsparin deleetio	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	23 emäsparin insertio	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	17 emäsparin deleetio	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	5 emäsparin insertio	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	3 emäsparin insertio	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	7 emäsparin insertio	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	6 emäsparin deleetio	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	5 emäsparin insertio	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	12 emäsparin insertio	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	2 emäsparin insertio	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	23 emäsparin deleetio	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	9 emäsparin insertio	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	1 emäsparin deleetio	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	8 emäsparin deleetio	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	11 emäsparin insertio	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	4 emäsparin deleetio	TAGTA>T	7	0	0	7	100

Amplikoni	Kromosomi	Sijainti	Analysoidun fragmentin koko	Amplikonin indelin tyyppi ja pituus	Indeli	Indelin sisältäviä näytereplikaatteja yhteensä	Ei tunnistuksia, määrä	Virheelliset indelitunnistukset	Oikeat indelitunnistukset	PPA
34	5	155662255	75	8 emäsparin insertio	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	21 emäsparin deleetio	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	3 emäsparin deleetio	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	25 emäsparin deleetio	CTTTCACCTTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	23 emäsparin deleetio	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	1 emäsparin insertio	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	4 emäsparin deleetio	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	1 emäsparin insertio	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	4 emäsparin deleetio	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	11 emäsparin deleetio	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	1 emäsparin deleetio	AG>A	15	15	0	0	Ei sovelleta
53	8	76518677	67	4 emäsparin insertio	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	4 emäsparin insertio	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	21 emäsparin deleetio	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	3 emäsparin deleetio	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	16 emäsparin deleetio	AGCGTCTATAACCAAT>A	11	0	0	11	100

Amplikonin Kromosomi	Sijainti	Analysoidun fragmentin koko	Amplikonin indelin tyyppi ja pituus	Indeli	Indelin sisältäviä näytereplikaatteja yhteensä	Ei tunnistuksia, määrä	Virheelliset indelitunnistukset	Oikeat indelitunnistukset	PPA	
64	10	55892600	89	2 emäsparin deleetio	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	2 emäsparin insertio	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	8 emäsparin insertio	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	8 emäsparin deleetio	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	2 emäsparin deleetio	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	21 emäsparin insertio	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	19 emäsparin insertio	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	4 emäsparin insertio	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	20 emäsparin deleetio	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	22 emäsparin deleetio	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	4 emäsparin insertio	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	16 emäsparin deleetio	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	5 emäsparin deleetio	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	6 emäsparin deleetio	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	25 emäsparin deleetio	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	3 emäsparin insertio	C>CTTG	9	0	0	9	100

Amplikonin Kromosomi	Sijainti	Analysoidun fragmentin koko	Amplikonin indelin tyyppi ja pituus	Indeli	Indelin sisältäviä näytereplikaatteja yhteensä	Ei tunnistuksia, määrä	Virheelliset indelitunnistukset	Oikeat indelitunnistukset	PPA
100	15	89864316	4 emäsparin insertio	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	7 emäsparin deleetio	ATTATTTTC>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	1 emäsparin deleetio	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	18 emäsparin insertio	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	4 emäsparin insertio	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	1 emäsparin insertio	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	24 emäsparin insertio	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	4 emäsparin deleetio	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	12 emäsparin deleetio	TTTGTATCTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	22 emäsparin insertio	T>TGTATCTTAGCAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	3 emäsparin insertio	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	2 emäsparin deleetio	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	15 emäsparin deleetio	TACTTGAGAAGTGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	5 emäsparin insertio	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	11 emäsparin insertio	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	16 emäsparin deleetio	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100

Amplikonin Kromosomi	Sijainti	Analysoidun fragmentin koko	Amplikonin indelin tyyppi ja pituus	Indeli	Indelin sisältäviä näyttereplikaatteja yhteensä	Ei tunnistuksia, määrä	Virheelliset indelitunnistukset	Oikeat indelitunnistukset	PPA
135	21	30300873	66	11 emäsparin insertio	G>GATAAACTTTA	9	0	9	100
137	21	36710749	87	21 emäsparin deleetio	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	9	100
138	21	46644985	69	5 emäsparin deleetio	GTTGTT>G	13	0	13	100
140	22	25750814	100	6 emäsparin insertio	C>CAGGGCA	13	0	13	100
142	22	37409885	97	5 emäsparin insertio	C>CTGTTT	13	0	13	100
144	22	47081407	92	10 emäsparin deleetio	GGGCACAGGCA>G	7	0	7	100

## Tutkimus 2

Tässä tutkimuksessa käytettiin kolorektaalisyövän FFPE-kudosnäytteitä kudospankista ja edustavaa kahden geenin määrittystä, jota verrattiin vertailumenetelmään, kaksisuuntaiseen Sangerin sekvensointiin (Sanger). Yhteensä 1183 tutkittavasta 441 tutkittavalla oli validi Sangerin tulos ja edustavat määrittystulokset. Tutkittavan tasolla arvioituna ([Taulukko 15](#)) 230 tutkittavaa 441:stä oli positiivisia Sangerin sekvensoinnilla (Sangerin menetelmällä havaittu mutaatio). Näistä 227 oli positiivisia edustavan määrittymen mukaan. Loput 211 tutkittavaa 441:stä olivat Sangerin sekvensoinnin mukaan negatiivisia (Sangerin menetelmällä ei havaittu mutaatiota). Näistä 206 oli negatiivista edustavan määrittymen mukaan. Tämä tuotti positiiviseksi yhtäpitävyysprosentiksi (PPA) 98,7 % ja negatiiviseksi yhtäpitävyysprosentiksi (NPA) 97,6 % ([Taulukko 15](#)).

Taulukko 15 Tutkittavan tasoisten tulosten positiivinen ja negatiivinen yhtäpitävyysprosentti

Edustava määrittys	Sanger		Yhteensä
	Positiivinen	Negatiivinen	
Positiivinen	227 <sup>1</sup>	5	232
Negatiivinen	3 <sup>2</sup>	206	209
Performance (Suorituskyky) Yhteenveto			
Yhtäpitävyys Tilasto	Piste-estimaatti	Tarkka 95 %:n CI	

Edustava määräyty	Sanger		Yhteensä
	Positiivinen	Negatiivinen	
Yhteensä	230	211	441

Performance (Suorituskyky) Yhteenveto		
Yhtäpitävyys Tilasto	Piste-estimaatti	Tarkka 95 %:n CI
PPA	227/230 = 98,7 %	[96,2 %; 99,7 %]
NPA	206/211 = 97,6 %	[94,6 %; 99,2 %]

<sup>1</sup>Tarkkoja vastaavuuksia oli 224 kohteen sisällä, kaikki mutaatiotason tuloksissa. MiSeqDx havaitsi 2 tutkittavalla henkilöllä Sangerin havaitseman mutaation ja 1 lisämutaation. Yhdellä tutkittavalla henkilöllä MiSeqDx ja Sanger havaitsivat eri mutaatioita.

<sup>2</sup>Yhdellä tutkittavalla oli kaksi Sangerin menetelmällä havaittua mutaatiota. Kahdella tutkittavalla oli yksi Sangerin menetelmällä havaittu mutaatio.

### Tutkimus 3

Tässä tutkimuksessa arvioitiin DNA-kirjastoja, jotka oli valmisteltu FFPE-näytteistä monista eri kudostyypeistä. Yhteensä 109 FFPE-näytettä kahdesta eri kudoksesta (koolon, munasarja, haima, lisämunuainen, virtsarakko, maksa, kilpirauhanen ja rinta), joista ainakin 11 FFPE-näytettä edusti kutakin kudostyyppiä). Lisämunuaiskudos sisälsi metastaaseja ruokatorven, keuhkojen ja koolonin kasvaimista. Muussa kudoksessa oli primaareja kasvaimia. Tutkimuksessa käytettiin edustavaa määritystä, joka on suunniteltu suorittamaan haku 26 geenistä ja 21 577 emäksestä 17 eri kromosomissa. Yhteensä kuusi eri geeniä (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* ja *BRAF*) Sanger-sekvensoitiin niin, että kustakin kasvaimesta Sanger-sekvensoitiin 1–3 geeniä kyseisen kasvaimen odotetun somaattisten mutaatioiden prevalenssin perusteella. Sanger-sekvensoinnin tuloksissa tunnistettiin 39 somaattista SNV-mutaatiota 33:ssa 109 FFPE-näytteestä. MiSeqDx tunnisti 36 somaattista SNV-mutaatiota 32:ssa 109 FFPE-näytteestä, ja tuotti yhden virheellisen negatiivisen tuloksen sekä kaksi varianttiaseman ei-tunnistusta. PPA oli 97,3 %. MiSeqDx tunnisti 78 975 viite-emästä 109 FFPE-näytteessä ja tuotti 29 virheellistä positiivista verrattuna Sangerin sekvensointiin ja 3416 ei-tunnistusta. NPA oli 99,9 %. Kahden emäksen deleetio oli samanlaista näiden kahden menetelmän välillä. [Taulukko 16](#) annetaan yhteenveto tuloksista kudostyyppin perusteella.

Taulukko 16 Positiivinen ja negatiivinen yhtäpitävyysprosentti kudostyypeittäin

Kudostyyppi	Näytteitä	Variantteja yhteensä	TP-variantteja yhteensä	FN-variantteja yhteensä	TN-tunnistukset yhteensä	FP-tunnistukset yhteensä	Tunnistamatta jääneet	PPA	NPA
Lisämunuainen	16	6	4	1	11 823	2	607	80	> 99,9
Virtsarakko	12	4	4	0	7070	3	273	100	> 99,9
Rinta	16	3	3	0	13 439	7	479	100	99,9
Koolon	11	6	5	0	8720	2	133	100	> 99,9
Maksa	13	3	3	0	7984	1	59	100	> 99,9
Munasarja	13	7	7	0	10581	1	724	100	> 99,99
Haima	17	7	7	0	11 929	12	489	100	99,9
Kilpirauhanen	11	3	3	0	7429	1	652	100	> 99,9
Yhteensä	109	39	36	1	78 975	29	3416	97,3	> 99,9

## Toistettavuus

MiSeqDx-laitteen toistettavuutta arvioitiin kahdessa tutkimuksessa FFPE-näytteistä eristetyllä DNA:lla. Tutkimuksessa 1 käytettiin useita laitteita. Tutkimuksessa 2 oli useita tutkimuspaikkoja.

## Tutkimus 1

MiSeqDx-laitteen toistettavuus määritettiin käyttämällä kahta laitetta ja kahta koulutettua käyttäjää, joilla tehtiin yhteensä kahdeksan ajoa. Edustava määritys, amplikonin genomisältö, näytteet ja viitemenetelmä ovat samat kuin mitä tarkkuustutkimuksessa 1 kuvaillaan. Tulokset on esitetty amplikonikohtaisesti kunkin laitteen osalta (Taulukko 17), jotta voidaan osoittaa tunnistusten toistettavuus eri laitteilla. Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus sisälsi sekä virheelliset tunnistukset että ei-tunnistetut (yksi tai useampi suodatin ei täyttnyt variantin tunnistuksessa). Laitteet tuottivat samanlaiset määrät ei-tunnistuksia kunkin amplikonin mukaan. MiSeqDx 1-laitteen osalta havaittiin yksittäinen virheellinen tunnistus Platinum Genomes -vertailustandardin määrittämällä luottamusalueella. Virheellinen tunnistus oli virheellinen positiivinen tunnistus insertiovariantista amplikonissa 64, jolla haettiin kromosomia 10 asemassa 55892599–55892687. Amplikonilla oli dinukleotidin toistona 11.



Taulukko 17 Tutkimuksen laitteiden väliset toistettavuustulokset MiSeqDx-laitteelle (amplikonin tasolla)

Amplikoni	Kromosomi	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet
1	1	93	93	Indeli	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indeli	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Indeli	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Indeli	0,49	5518	0	2	5518	0	2
5	1	81	81	PolyG (5)	0,69	4858	0	2	4860	0	0
6	1	70	70	PolyT (10) indeli	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA (3), indeli	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Indeli	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Indeli	0,38	4800	0	0	4800	0	0
10	2	85	81	Ei sovelleta	0,65	4859	0	1	4859	0	1
11	2	75	75	PolyA (8)	0,35	4468	0	40	4468	0	40
12	2	88	88	PolyT (5)	0,42	5280	0	0	5280	0	0
13	2	87	87	PolyT (5), indeli	0,31	5211	0	43	5214	0	40
14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indeli	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	Ei sovelleta	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	PolyT (5), indeli	0,42	4378	0	2	4379	0	1
17	3	93	93	AT(3), indeli	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	Ei sovelleta	0,43	4980	0	0	4980	0	0
19	3	70	70	CT(3), indeli	0,49	4193	0	7	4194	0	6

Amplikoni	Kromosomi	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet
20	3	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	5220	0	120	5220	0	120
21	3	75	74	Indeli	0,57	4432	0	8	4432	0	8
22	4	78	78	PolyA (6)	0,26	4676	0	4	4676	0	4
23	4	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	5820	0	0	5820	0	0
24	4	78	78	Ei sovelleta	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	PolyA (5), indeli	0,36	3720	0	0	3720	0	0
26	4	71	69	PolyA (5)	0,46	4140	0	0	4140	0	0
27	4	62	62	PolyA (7), indeli	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	Ei sovelleta	0,78	3368	0	1132	3485	0	1015
29	5	84	84	GT(3), CCA (3)	0,62	5040	0	0	5040	0	0
30	5	64	64	Ei sovelleta	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	PolyA (6), indeli	0,3	4979	0	1	4980	0	0
32	5	67	67	PolyT (5)	0,37	4020	0	0	4020	0	0
33	5	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	5460	0	0	5460	0	0
34	5	75	75	Indeli	0,43	4498	0	6	4500	0	1
35	6	102	102	PolyG (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0
36	6	92	92	Indeli	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), indeli	0,61	5532	0	108	5532	0	108

Amplikoni	Kromosomi	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet
38	6	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60
39	6	95	95	Indeli	0,53	5697	0	3	5698	0	2
40	6	86	86	PolyC (6)	0,7	5159	0	1	5160	0	0
41	6	95	94	PolyG (5), indeli	0,61	5638	0	2	5638	0	2
42	6	91	91	PolyA (5)	0,44	5460	0	0	5460	0	0
43	7	73	73	Ei sovelleta	0,44	4380	0	0	4380	0	0
44	7	88	88	Indeli	0,35	5279	0	1	5276	0	4
45	7	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	5184	0	36	5181	0	39
46	7	85	85	Indeli	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	PolyG (5), indeli	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indeli	0,71	5460	0	0	5459	0	1
49	7	81	66	Ei sovelleta	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	Indeli	0,35	5580	0	0	5579	0	1
51	8	83	83	Ei sovelleta	0,42	4980	0	0	4980	0	0
52	8	90	89	PolyG (7), CTC(4), indeli	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Indeli	0,3	4020	0	0	4020	0	0
54	9	98	98	PolyG (6)	0,67	5879	0	1	5880	0	0
55	9	65	65	Indeli	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	Ei sovelleta	0,49	5760	0	0	5760	0	0
57	9	83	83	AT(3)	0,37	4973	0	7	4978	0	2

Amplikoni	Kromosomi	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet
58	9	97	97	PolyC (6), indeli	0,68	5817	0	3	5818	0	2
59	10	79	78	PolyG (5), indeli	0,47	4679	0	1	4680	0	0
60	10	98	91	GC(3)	0,87	450	0	5010	632	0	4828
61	10	79	79	PolyT (5)	0,3	4740	0	0	4740	0	0
62	10	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	5400	0	0	5400	0	0
63	10	95	95	Indeli	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	AC(11), indeli	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	Ei sovelleta	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	Ei sovelleta	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	Ei sovelleta	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	Indeli	0,46	4199	0	2	4200	0	1
69	11	100	100	Ei sovelleta	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	Indeli	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	Ei sovelleta	0,59	6120	0	0	6118	0	2
72	11	73	73	PolyA (5)	0,4	4380	0	0	4380	0	0
73	11	85	85	Ei sovelleta	0,42	5100	0	0	5100	0	0
74	11	91	91	PolyG (6)	0,55	5437	0	23	5441	0	19
75	11	85	85	Indeli	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	Poly A (5), CA(3), indeli	0,34	5100	0	0	5100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5100	0	0	5100	0	0
78	12	84	84	PolyC (5), indeli	0,52	5040	0	60	5038	0	63
79	12	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	5577	0	3	5573	0	7
80	12	81	81	Ei sovelleta	0,49	4860	0	0	4860	0	0

Amplikoni	Kromosomi	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet
81	12	71	71	PolyA (6)	0,35	4260	0	0	4260	0	0
82	2	95	95	PolyG (5)	0,68	5605	0	95	5605	0	95
83	13	73	73	Ei sovelleta	0,52	4380	0	0	4379	0	1
84	13	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indeli	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Indeli	0,49	5340	0	0	5340	0	0
86	13	77	77	Indeli	0,39	4620	0	0	4620	0	0
87	14	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	4020	0	0	4020	0	0
88	14	83	83	Ei sovelleta	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	PolyT (5), indeli	0,19	4173	0	147	4173	0	147
90	14	81	81	Indeli	0,38	4860	0	2	4860	0	0
91	14	91	91	Indeli	0,35	5459	0	1	5460	0	0
92	14	66	66	PolyA (5)	0,41	3900	0	240	3900	0	240
93	14	94	94	Indeli	0,62	5637	0	3	5637	0	3
94	15	98	96	PolyC (5)	0,45	5760	0	0	5760	0	0
95	15	68	68	Indeli	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	PolyG (5), indeli	0,68	5475	0	105	5487	0	93
97	15	95	95	PolyT (6)	0,43	5699	0	1	5700	0	0
98	15	72	71	Indeli	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	Ei sovelleta	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Indeli	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	Ei sovelleta	0,27	3780	0	0	780	0	0
102	16	95	95	PolyC (5)	0,67	5700	0	0	5700	0	0
103	16	87	87	TA(3)	0,41	5220	0	0	5220	0	0

Amplikoni	Kromosomi	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet
104	16	104	104	PolyC (5)	0,67	6238	0	3	6238	0	3
105	16	91	91	PolyT (5), indeli	0,37	5443	0	17	5444	0	16
106	17	89	89	GC(3)	0,64	5251	0	89	5339	0	1
107	17	87	87	PolyC (5), indeli	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	Indeli	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Indeli	0,26	5580	0	0	5580	0	0
110	17	91	89	PolyT (5)	0,54	5340	0	0	5340	0	0
111	17	84	82	Poly A (13), indeli (x2)	0,29	4860	0	308	4860	0	07
112	17	91	91	PolyA (5)	0,34	5459	0	1	5459	0	1
113	17	92	92	PolyA (7), AT (3), AT(4), AT(4), indeli	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	Indeli	0,41	4699	0	41	4700	0	40
115	17	86	86	PolyT (7)	0,22	5153	0	7	5156	0	4
116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5039	0	1	5039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4020	0	0	4020	0	0
118	18	91	91	Ei sovelleta	0,37	5460	0	0	5460	0	0
119	18	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9
120	18	75	75	PolyA (5), indeli	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	CTC(3), indeli	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	CT(3), indeli	0,45	5098	0	2	5098	0	2
123	18	65	65	Ei sovelleta	0,48	3900	0	0	3900	0	0
124	19	99	99	Ei sovelleta	0,59	5926	0	14	5924	0	16

Amplikoni	Kromosomi	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet
125	19	74	74	Ei sovelleta	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	Ei sovelleta	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	Ei sovelleta	0,61	5640	0	1	5638	0	3
128	20	82	82	AC(3)	0,59	4920	0	0	4920	0	0
129	20	76	76	CT(3)	0,58	4559	0	1	4558	0	2
130	20	70	70	GT(3),TG(4), indeli	0,46	4200	0	0	4200	0	0
131	20	101	101	Indeli	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	Indeli	0,36	4020	0	31	4020	0	25
133	20	91	88	PolyG (6)	0,73	5277	0	3	5274	0	6
134	20	87	87	Indeli	0,57	5218	0	2	5218	0	2
135	21	66	66	Indeli	0,35	3959	0	1	3957	0	3
136	21	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	5880	0	0	5880	0	0
137	21	87	87	GT(3), indeli	0,39	5220	0	0	5220	0	0
138	21	69	69	PolyA (6), AG(3), indeli	0,32	4119	0	31	4113	0	37
139	21	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	5399	0	1	5399	0	1
140	22	100	100	Indeli	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	Ei sovelleta	0,68	5819	0	1	5819	0	1
142	22	97	97	Indeli	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	Ei sovelleta	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	Indeli	0,66	5519	0	1	5519	0	1
145	X	69	69	PolyT (5)	0,26	4139	0	1	4140	0	0
146	X	69	69	PolyC (5)	0,62	4136	0	4	4137	0	3
147	X	71	71	Ei sovelleta	0,52	4260	0	0	4260	0	0

Amplikoni	Kromosomi	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Tunnistamatta jääneet
148	Y	65	0	Ei sovelleta	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	Ei sovelleta	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Toistettavuustutkimukset analysoitiin käyttäjäkohtaisesti käyttämällä variantin taajuutta (Taulukko 18). Tämä analyysi osoitti, että varianttitiheydet olivat yhdenmukaisia eri käyttäjien välillä. Keskimääräiset varianttitiheydet +/- 1 keskihajonta on esitetty.

Taulukko 18 Käyttäjien väliset tulokset MiSeqDx-laitteesta

Varianttitiheysalue	Yksilölliset variantit	Käyttäjän 1 analysoimat variantit yhteensä	Käyttäjän 2 analysoimat variantit yhteensä	Käyttäjän 1 raportoima keskimääräinen (SD) varianttitiheys	Käyttäjän 2 raportoima keskimääräinen (SD) varianttitiheys
Korkea tiheys (~100 %)	1112	1072	1072	0,96 +/- 0,05	0,96 +/- 0,05
Keskitiheys (~50 %)	3240	3151	3161	0,49 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04
Matala tiheys (3-7 %)	620	618	612	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01

Kunkin näytteen toistettavuustutkimuksen tulokset on esitetty koottuna kaikista kahdeksasta ajosta (Taulukko 19). Kunkin varianttityypin – SNV:t, insertiot ja deleetiot – tunnistus arvioidaan erikseen. Viitesijainnit on poissuljettu. Tämä analyysi osoitti, että varianttien tulokset olivat toistettavissa näytteestä toiseen.



Taulukko 19 MiSeqDx-laitteen emäksen tunnistustulosten yhtäpitävyys näytteittäin

Näyte	SNV:t			Insertiot				Deleetiot				
	Yhteensä	TP yhteensä	FP yhteensä	FN yhteensä	Yhteensä	TP yhteensä	FP yhteensä	FN yhteensä	Yhteensä	TP yhteensä	FP yhteensä	FN yhteensä
GM12877	592	574	2	0	336	336	0	0	228	272	0	0
GM12878	1456	1432	0	0	320	304	0	0	384	352	0	0
GM12879	912	896	0	0	336	320	0	0	288	272	0	0
GM12885	1200	1192	0	0	400	384	0	0	352	320	0	0
GM12886	1104	1104	0	0	368	352	0	0	368	352	0	0
GM12877-D1 <sup>1</sup>	3640	3582	0	0	800	760	0	0	960	880	0	0
GM12877-D2 <sup>2</sup>	400	398	0	0	520	516	0	0	560	556	0	0

<sup>1</sup>Variantit, joiden esiintymistiheys on yli 20 %.

<sup>2</sup>Varianteetti, jonka esiintymistiheys on alle 20 %.

Tämän toistettavuustutkimuksen 8 ajon tuottamat tiedot tukevat väitettä, että MiSeqDx-laite kykenee sekvensoimaan yhdenmukaisesti

- GC-sisällön, jota on  $\geq 19$  % (kaikki tunnistetut emäkset 120/120 sekvensoidusta amplikonista, joissa on 19 %:n GC-sisältö, tunnistettiin oikein ei-tunnistusravolla 3,4 %)
- GC-sisällön, jota on  $\leq 73$  % (kaikki tunnistetut emäkset 120/120 sekvensoidusta amplikonista, joissa on 73 %:n GC-sisältö, tunnistettiin oikein ei-tunnistusravolla 0,1 %)
- PolyA-pituudet  $\leq 8$  (PolyA:n 8 nukleotidin toisto tunnistettiin oikein 120/120 sekvensoidusta amplikonista, jossa oli PolyA = 8)
- PolyT-pituudet  $\leq 10$  (PolyA:n 10 nukleotidin toisto tunnistettiin oikein 120/120 sekvensoidusta amplikonista, jossa oli PolyT = 10)
- PolyG-pituudet  $\leq 6$  (PolyG:n 6 nukleotidin toisto tunnistettiin oikein 720/720 sekvensoidusta amplikonista, jossa oli PolyG = 6)
- PolyC-pituudet  $\leq 6$  (PolyC:n 6 nukleotidin toisto tunnistettiin oikein 359/360 sekvensoidusta amplikonista, jossa oli PolyC = 6, ja yksi tunnistamaton)
- Dinukleotidin toistopituudet, jotka ovat  $\leq 4x$  (kaikki tunnistetut emäkset 600/600 sekvensoidusta amplikonista, joissa on 4x dinukleotidin toisto, tunnistettiin oikein 0,4 %:n ei-tunnistusten arvolla)

- Trinukleotidin toistopituudet, jotka ovat  $\leq 5x$  (kaikki tunnistetut emäkset 120/120 sekvensoidusta amplikonista, joissa on 5x trinukleotidin toisto, tunnistettiin oikein ei-tunnistusarvolla 1,9 %)
- enintään 24 emäsinseriota ja enintään 25 emäsdeleetiota
  - 24 emäksen insertiot tunnistettu oikein 120/120 näytteessä
  - 25 emäksen deleetiot tunnistettu oikein 182 näytteessä ja raportoitu ei-tunnistettuina kahdessa näytteessä 184:stä

## Tutkimus 2

Ulkoisella tutkimuksella arvioitiin tarkkuustutkimuksessa 2 kuvatun, edustavan kahden geenin määrittämisen toistettavuutta kolmella ulkoisella testauspaikalla (kaksi käyttäjää testauspaikkaa kohti), yhdellä reagenssierällä ja kolmena ei-peräkkäisenä testauspäivänä. Testaus toteutettiin kuudella hyvin luokitellulla näytepaneelilla, jotka koostuivat kliinisistä FFPE-näytteistä tai solulinjoista peräisin olevasta genomisesta DNA:sta. Kukin paneeli sisälsi 10 osaa eli yhteensä 60 osaa kaikista paneeleista.

60 paneelin osaa sisälsi duplikaatteja neljästä uniikista villityypin (paneelimutaatioiden osalta) näytteestä, 12 uniikista mutantinäytteestä (joissa oli yksittäinen mutaatio) valmisteltuna sekä korkealla että matalalla mutaatiotiheydellä sekä kaksi uniikkia mutantinäytettä (joissa oli yksittäinen mutaatio) valmisteltuna matalalla mutaatiotiheydellä. Jokaisella uniikilla näytteen/mutaation tiheystasonäytteellä (testattuna duplikaattina kussakin ajossa) oli 36 mahdollista tulosta (2 replikaattia  $\times$  2 testaajaa  $\times$  3 päivää  $\times$  3 testauspaikkaa), jos kaikki tulokset olivat valideja.

Odotettujen tulosten prosenttiosuus (PEC) kaikista positiivisista ja negatiivisista varianteista arvioitiin vertaamalla edustavaa määritystulosta kunkin näytteen odotettuun mutaatiotulokseen (odotettu mutaatio havaittu tai ei havaittu). PEC lasketaan kaavalla 100 % kertaa odotettujen tunnistusten määrä jaettuna yritettyjen tunnistusten määrällä. Kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli lasketaan Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Yhdistettäessä testauspaikat näytteen hyväksyntäasteet olivat  $\geq 94,7$  % näytteen ensimmäisessä ajossa tai näytteissä, jotka testattiin ensimmäisellä kerralla valideissa ajoissa. Mutaatiotason PEC kaikissa mutantinäytteissä oli 99,6 % (905/909) (95 %:n CI; 98,9; 99,8). Yritettyjen tunnistusten määrä kaikissa 56 paneelimutaatiossa (huolimatta siitä, oliko havaittu mutaatio odotettu tai ei) kaikista valideista näytteistä oli 58 856 (56  $\times$  1051). Näistä 58 856 mutaatiotason havainnosta vain kuudessa tapauksessa havaittu ja odotettu tulos oli eri. Mutaatiotason PEC kaikista positiivisista ja negatiivisista varianteista kaikista mutanti- ja villityyppipaneeliosista oli yhteensä 99,99 % (58 850/58 856).

## Analyttinen herkkyys (tyhjän raja [LoB] ja määrittämisen tunnistusraja [LoD])

Tässä tutkimuksessa vahvistettiin MiSeqDx-laitteen määrittämisen raja ja määritettiin määrittämisen tunnistusraja (LoD) edustavalla paneelilla. Lyhyesti sanottuna, hyvin luonnehditut Platinum Genomen solulinjat GM12878 ja GM12877 fiksoitiin formaliiniin ja peitettiin parafiinilla ennen DNA:n eristämistä. GM12878:aa laimennettiin GM12877:llä siten, että 70 variantin esiintymistiheydet (52 SNV, 9 insertiota ja 9 deleetiota) olivat lähellä 0,05:tä. Kaksi testaajaa testasi kaksi DNA-näytettä käyttämällä kahta laitetta ja kahta reagenssierää, joten MiSeqDx-sekvensointiajoja tehtiin yhteensä 10. Tämä tuotti 40 replikaattia kullekin variantille GM12878 ja 60 replikaattia kullekin vastaavalle villityypin koordinaatille GM12877:ssä kunkin reagenssierän osalta. LoB ja LoD laskettiin käyttämällä perinteistä lähestymistapaa, CLSI EP17-A2, ei-parametrisella menetelmällä. LoB ja LoD laskettiin SNV:iden, insertioiden ja deleetioiden osalta erikseen yhdistämällä eri taajuudet tietyn varianttityypin osalta. Tyypin I virheeksi määritettiin 0,01, ja tyypin II virheeksi määritettiin 0,05.

LoB:n osalta yhdistetyt varianttitaajuudet järjestettiin alimmasta ylimpään, ja 99. sija kullekin reagenssierälle kussakin varianttityypissä laskettiin (Taulukko 20). MiSeqDx-laitteen ohjelmisto käyttää raja-arvoa (todellinen LoB) 0,026 varianttitiheys varianttien laadullisen havaitsemisen määrittämiseksi. Laskettu tyhjän raja vahvisti, että tämä raja-arvo saa aikaan tyypin I virheen, joka on enintään 0,01.

Taulukko 20 Tyhjän raja

Varianttityyppi	Varianttitiheyksien kokonaismäärä	LoB:n reagenssierä 1 (%)	LoB:n reagenssierä 2 (%)
SNV	3120	0,87	0,75
Insertio	540	0,79	0,60
Deleetio	540	0,96	0,84

LoD:n osalta laskettiin yksittäisen mutaatiotaajuuden prosenttimäärä kullekin reagenssierälle kussakin varianttityypissä, joka on alle raja-arvon 0,026 (Taulukko 21). Koska prosenttimäärät olivat pienemmät kuin tyypin II virhe 5 % (0,05), yhdistettyjen varianttitaajuuksien mediaani laskettiin LoD-arvona (Taulukko 21). Kunkin varianttityypin LoD otettiin suurempana kahdesta arvosta, jotka laskettiin kahden reagenssin erälle: -5,45 % SNV:ille; 4,88 % insertioille ja 5,44 % deleetioille.

Taulukko 21 Määrityksen tunnistusraja

Reagenssierä	Varianttityyppi	Varianttitiheyksien kokonaismäärä	Määrä, VF-mittaukset < 2,6 %	%-osuus, VF-mittaukset < 2,6 %	Määrityksen tunnistusraja (%)
1	SNV	2080	4	0,20	5,45
	Insertio	360	0	0,00	4,86
	Deleetio	360	2	0,60	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Insertio	360	0	0,00	4,88
	Deleetio	360	0	0,00	5,24

Seuraavat tutkimukset osoittavat MiSeqDx-laitteen suorituskykyominaisuudet toisella edustavalla määrityksellä, joka kohdistuu 56 mutaatioon kahdessa kliinisesti relevantissa syöpägeenissä (mutaatiopaneeli). Mutaatiopaneeli on suunniteltu nimenomaan havaitsemaan 56 mutaatiota kahdessa kliinisesti relevantissa syöpägeenissä (geeni 1 ja geeni 2). Määritys määrittää samanaikaisesti kunkin 56 mutaation läsnäolon tai puuttumisen jokaisessa sekvensoidussa näytteessä. Näiden tutkimusten vertailumenetelmä oli kaksisuuntainen Sangerin sekvensointi.

## Erien välinen tarkkuus

Erien välisellä tarkkuustutkimuksella arvioitiin MiSeqDx-laitteen suorituskykyä eri reagenssierien kanssa (koostuu näytteen kvalifioinnista, kirjaston valmistelusta ja reagenssien sekvensoinnista) mainittujen kahden geenin edustavalla määrityksellä käyttämällä viiden sekoitetun FFPE-näytteen paneelia, joka täytti näytteen kvalifiointivaatimukset. Jokainen FFPE-näyte sisälsi kaksi uniikkia mutaatiota: toinen matalammalla (noin 8 %:n) mutaatiotiheystasolla ja toinen korkealla (noin 14 %:n) mutaatiotiheystasolla. 12 havaintoa kustakin viidestä näyteseoksesta saatiin kolmena ei-peräkkäisenä päivänä kolmella reagenssipakkauserällä. Tutkimuksen havaintojen kokonaismäärä kaikissa reagenssierissä oli 180 havaintoa kaikissa näyteseoksissa ja 360 havaintoa kaikilla mutaatiotiheystasoilla. Kaikkien erien ja päivien osalta 99,7 %:ssa (359/360) havainnoista ilmeni odotettu mutaatiotulos. Yksi matalan tiheystason mutaatio tunnistettiin virheellisesti villityypiksi. Kullekin mutaatiolle / mutaatiotaajuuden tasolle tehtiin varianssikomponenttien analyysi järjestelmän vaihtelevuuden arvioimiseksi. Kokonaiskeskihajonta vaihteli välillä 0,011–0,029. Kokonaiskeskihajonnan reagenssieräkomponentti vaihteli välillä 0–0,015.

## Versiohistoria

Asiakirjan nro	Päivämäärä	Muutoksen kuvaus
Asiakirjanumero 200006218 v02	Lokakuu 2023	Päivitetty viittaukset Local Run Manageriin versiota 4 varten. Merkintöjä on päivitetty Australian toimeksiantajan tietojen lisäämiseksi. Korjattu poikkeamat kohdissa, joissa pakkausseloste poikkeaa MiSeqDx-laitteen tarkistustutkimuksen raportista.
Asiakirjanumero 200006218 v01	Toukokuu 2022	MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro -sarjan pakkausselosteen luettelonro lisätty kohtaan "Tarvittavat välineet ja materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen". MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro -sarjan testaustiedot lisätty kohtaan "Suorituskykyominaisuudet". Vain Yhdysvaltoja koskeva varoitushuomautus poistettu kohdasta "Varoitukset ja varotoimet".
Asiakirjanumero 200006218 v00	Marraskuu 2021	Ensimmäinen julkaisu MOS-ohjelmiston version 4.0 ja Local Run Manager -ohjelmiston version 3.0 tueksi.

## Patentit ja tavaramerkit

Tämä asiakirja ja sen sisältö ovat Illumina, Inc:n ja sen tytäryhtiöiden ("Illumina") omaisuutta, ja ne on tarkoitettu ainoastaan Illumina-yhtiön asiakkaiden sopimuskäyttöön tässä kuvattujen tuotteiden käyttöön liittyen eikä mihinkään muuhun tarkoitukseen. Tätä asiakirjaa ja sen sisältöä ei saa käyttää tai jakaa missään muussa tarkoituksessa ja/tai välittää, paljastaa tai jäljentää millään muulla tavoin ilman Illumina-yhtiöltä ennakkoon saatua kirjallista lupaa. Illumina ei tällä asiakirjalla luovuta mitään käyttöoikeuksia sen patenti-, tavaramerki-, tekijänoikeus- tai tapaoikeuksien nojalla eikä vastaavien kolmansien osapuolten oikeuksien nojalla.

Tässä kuvattuja tuotteita saa käyttää vain pätevä ja asianmukaisesti koulutettu henkilökunta noudattamalla täsmällisesti tässä asiakirjassa annettuja ohjeita, jotta tuotteiden asianmukainen ja turvallinen käyttö voidaan taata. Asiakirjan sisältö on luettava ja ymmärrettävä kokonaisuudessaan ennen näiden tuotteiden käyttöä.

MIKÄLI KAIKKIA TÄSSÄ ANNETTUJA OHJEITA EI LUETA JA TÄSMÄLLISESTI NOUDATETA, SEURAUKSENA VOI OLLA TUOTTEIDEN VAURIOITUMINEN, HENKILÖVAHINKOJA JOKO KÄYTTÄJILLE TAI MUILLE JA MUITA OMAISUUSVAHINKOJA, MINKÄ LISÄKSI TUOTTEITA MAHDOLLISESTI KOSKEVAT TAKUUT MITÄTÖITYVÄT.

ILLUMINA EI OLE VASTUUSSA TÄSSÄ KUVATTUJEN TUOTTEIDEN VÄÄRINKÄYTÖSTÄ (MUKAAN LUKIEN TUOTTEEN OSAT JA OHJELMISTO).

© 2023 Illumina, Inc. Kaikki oikeudet pidätetään.

Kaikki tavaramerkit ovat Illumina, Inc:n tai niiden vastaavien omistajien omaisuutta. Tarkemmat tavaramerkkitiedot ovat verkkosivustolla [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Yhteystiedot



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 U.S.A.  
+1 800 809 ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (Pohjois-Amerikan  
ulkopuolella)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com

CE



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

### Rahoittaja Australiassa

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

## Tuotteiden merkinnät

Katso kaikkien tuotteen pakkauksessa ja merkinnöissä käytettyjen symbolien selitykset verkko-osoitteesta [support.illumina.com](http://support.illumina.com) käyttämäsi pakkauksen välilehdeltä *Documentation* (Dokumentaatio).