

MiSeqDx[®] cystisk fibrose 139-variantanalyse

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK

Katalognr. DX-102-1004: 2 kjøringer, opptil 96 prøver per sett

Katalognr. DX-102-1003: 20 kjøringer, opptil 960 prøver per sett

Tiltenkt bruk

illumina MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalysen er et kvalitativt *in vitro*-diagnostisk system som brukes til samtidig deteksjon av 139 klinisk relevante cystisk fibrose-forårsakende mutasjoner og varianter av det transmembrane ledeevneregulatorgenet for cystisk fibrose (*CFTR*) i genomisk DNA, isolert fra humant perifere fullblodsprøver. Variantene inkluderer de som var anbefalt i 2004 av American College of Medical Genetics (ACMG)¹ og i 2011 av American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)². Testen er beregnet på bærerundersøkelse hos voksne i reproduktiv alder, i diagnostisk bekreftelsestesting av nyfødte og barn og som en innledende test for å bistå i diagnostiseringen av personer med mistenkt cystisk fibrose. Resultatene av denne testen er ment å bli tolket av en nemndsertifisert klinisk molekylær genetiker eller tilsvarende og bør brukes sammen med annen tilgjengelig laboratorieinformasjon og klinisk informasjon.

Testen er ikke beregnet brukt på screening av nyfødte, føtal diagnostisk testing, preimplantasjonstesting eller for enkeltstående diagnostiske formål.

Denne testen er beregnet for bruk på illumina MiSeqDx-instrumentet.

Oppsummering og forklaring av analysen

Klinisk beskrivelse

Cystisk fibrose (CF) er en av de vanligste genetiske lidelsene i den vestlige verden og den vanligste livstruende autosomale recessive lidelsen i den ikke-spanske hvite befolkningen^{3,7}. CF innvirker på viskositeten i slimsekretet, og påvirker epitelet i luftveiene, bukspyttkjertelen, tarmene, lever-galle-systemet, mannlig genitalkanal og svettekjertlene, som resulterer i kompleks multiorgan-, multisystem-sykdom^{4,6} der lungene er det primære organsystemet assosiert med morbiditet og mortalitet⁸. I mange tilfeller vil tilbakegang i ernæringen være et forvarsel på CF-lungesykdom, slik at et viktig fokus på gjeldende intervensjonelt arbeid er tidlig diagnostisering ved nyfødtscreening⁷ og dermed legge til rette for rask tilgang til livsviktige medisinske tjenester og oppnå best mulig resultat for personer med sykdommen^{4,7}. Selv om det er kjønnsforskjeller i overlevelse, med median rapportert overlevelse høyere hos menn enn hos kvinner, er generell median overlevelse i USA 38,3 år⁸.

CFTR-varianter og insidens

Cystisk fibrose transmembran ledeevneregulatorgenet (*CFTR*), identifisert i 1989, befinner seg på den lange grenen på kromosom 7 og inneholder 27 kodingseksoner, spredt over 230 kb⁴. Et 6,5 kb mRNA, produsert av den normale allelen, koder *CFTR*, et 1490-aminosyre-integralt membranprotein som fungerer som en regulert kloridkanal i epitelceller i flere organer^{4,5}. Mer enn 1900 varianter av *CFTR* er nå beskrevet, og de fleste er punktmutasjoner⁹. Den vanligste *CFTR*-varianten er F508del-allelen⁵, som utgjør nesten 70 % av alle *CFTR*-variantene³. Andre vanlige *CFTR*-varianter resulterer imidlertid ofte i en CF-fenotype og andre *CFTR*-relaterte lidelser³⁻⁵.

Cystisk fibrose har en sykdomsinsidens anslått å være én av 2000 til 4000 levendefødte og en prevalens på omtrent 30 000 personer i USAs befolkning⁴. Det forekommer i alle etniske og rasemessige befolkninger med varierende frekvenser: én av 3000 kaukasiere, én av 9200 latinamerikanere, én av 10 900 indianere, én av 15 000 afroamerikanere og én av 31 000 asiatiske amerikanere^{4,6}. Gjeldende estimater av mutasjonsbærerfrekvensen for *CFTR* etter etnisitet i USA, basert på en kohort på 364 890 personer som var henvist til bærertesting uten familiehistorie med CF, finnes i [Tabell 1](#).

Tabell 1 Generell mutasjonsbærerfrekvens for cystisk fibrose i ulike etniske grupper i USA¹⁰

Etnisk gruppe	Observert bærerfrekvens
Afroamerikanere	1 av 84
Askenasiske jøder	1 av 29
Asiatiske	1 av 242
Kaukasiere	1 av 28
Latinamerikanere	1 av 59
Jøder	1 av 32
Fra Midt-Østen	1 av 91
Indianere	1 av 70
Fra Sør-Asia	1 av 118
Annen etnisitet	1 av 111
> 1 etnisitet	1 av 34
Delvis afroamerikanere	1 av 56
Delvis kaukasisk	1 av 32
Delvis latinamerikansk	1 av 51
Ikke oppgitt	1 av 37
Alle personer	1 av 38

Oversikt over CFTR2-prosjektet

CFTR2-prosjektet er et internasjonalt initiativ ledet av et team av forskere og klinikere, og støttes av et tilskudd fra National Institute of Health og amerikanske Cystic Fibrosis Foundation.^{11,12} CFTR2 er ment å gi omfattende og ekspertvurdert funksjonell og klinisk informasjon om *CFTR*-varianter. I et forsøk på klinisk å validere alle CF-varianter med allefrekvenser på 0,01 % og større, satte 25 CF-registre og klinikker fra hele verden¹³ sammen ressurser med mål om å samsvare klinisk informasjon fra over 39 000 CF-pasienter med de nesten 1900 CF-variantene som er registrert opp gjennom årene i CFTR1-databasen hos Hospital for Sick Children i Toronto.^{11,13} Kliniske egenskaper, som svettekloridkonsentrasjon, lungefunksjon (predikert FEV1%) og pankreatisk status, ble analysert sammen med informasjon om *CFTR*-genotype. Den systematiske metoden for samtidig analyse av disse variantene fra kliniske, funksjonelle og genetiske perspektiver ga 134 unike CF-fremkallende varianter på 129 unike genomiske posisjoner (fordi for fem posisjoner vises to nukleotidendringer på samme posisjon) i CFTR2-databasen (per august 2013). Bruk av et panel som omfatter alle disse variantene, forventes å stå for 95,4 % av cystisk fibrose-fremkallende alleler og øker identifikasjonen av parene i risikozonen gjennom detektering av begge allelene til ~91 % fra 72 % med det ACMG-anbefalte panelet på 23 varianter.

CFTR-varianter i panelet

Variantene som ble rapportert av MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalysen ble valgt spesifikt fordi de representerer det fullstendige settet med klinisk validerte varianter, klassifisert om CF-fremkallende i CFTR2-databasen ved Johns Hopkins University, et produkt av CFTR2-initiativet (Klinisk og funksjonell oversettelse av CFTR).

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

De 134 CF-fremkallende variantene tilsvarer 129 CF-fremkallende varianter i CFTR2-databasen. CFTR2-databasen inkluderer fem CF-fremkallende varianter, der den samme proteinnivåendringen kan oppstå fra to distinkte nukleotidendringer [f.eks. S466X(C>A) og S466X(C>G)]. Disse fem variantene er oppført i samsvar med aminosyrekodonet i CFTR2-databasen (f.eks. S466X), mens analysen rapporterer hver individuelle variant [f.eks. S466X(C>A) og S466X(C>G)]. Listen over 139 varianter rapportert av MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalysen finnes i [Tabell 2](#).

Tabell 2 Sammendrag av varianter for MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse

[Varianter er oppgitt i genomisk samordnet rekkefølge, der den tilknyttede nukleotidnivåendringen for hver variant står i parentes. Fet skrift = ACMG-23; Kursiv = Betinget rapportert]

M1V (c.1A>G)	T338I (c.1013C>T)	R553X (c.1657C>T)	3272-26A>G (c.3140-26A>G)
CFTRdele2,3 (c.54-5940_273+10250del21kb)	S341P (c.1021T>C)	A559T (c.1675G>A)	L1065P (c.3194T>C)
Q39X (c.115C>T)	1154insTC (c.1022_1023insTC)	R560T (c.1679G>C)	R1066C (c.3196C>T)
E60X (c.178G>T)	R347H (c.1040G>A)	R560K (c.1679G>A)	R1066H (c.3197G>A)
P67L (c.200C>T)	R347P (c.1040G>C)	1811+1.6kbA>G (c.1679+1.6kbA>G)	L1077P (c.3230T>C)
R75X (c.223C>T)	R352Q (c.1055G>A)	1812-1G>A (c.1680-1G>A)	W1089X (c.3266G>A)
G85E (c.254G>A)	1213delT (c.1081delT)	E585X (c.1753G>T)	Y1092X(C>A) (c.3276C>A)
394delTT (c.262_263delTT)	1248+1G>A (c.1116+1G>A)	1898+1G>A (c.1766+1G>A)	Y1092X(C>G) (c.3276C>G)
405+1G>A (c.273+1G>A)	1259insA (c.1127_1128insA)	1898+3A>G (c.1766+3A>G)	M1101K (c.3302T>A)
406-1G>A (c.274-1G>A)	W401X (c.1202G>A)	2143delT (c.2012delT)	E1104X (c.3310G>T)
E92X (c.274G>T)	W401X (c.1203G>A)	2183AA >G (c.2051_ 2052delAAinsG)	R1158X (c.3472C>T)
E92K (c.274G>A)	1341+1G>A (c.1209+1G>A)	2184delA (c.2052delA)	R1162X (c.3484C>T)
Q98X (c.292C>T)	1461ins4 (c.1329_ 1330insAGAT)	2184insA (c.2052_2053insA)	3659delC (c.3528delC)
457TAT>G (c.325_327delTATinsG)	A455E (c.1364C>A)	R709X (c.2125C>T)	S1196X (c.3587C>G)
D110H (c.328G>C)	1525-1G>A (c.1393-1G>A)	K710X (c.2128A>T)	W1204X (c.3611G>A)
R117C (c.349C>T)	S466X (C>A) (c.1397C>A)	2307insA (c.2175_2176insA)	W1204X (c.3612G>A)
R117H (c.350G>A)	S466X (C>G) (c.1397C>G)	L732X (c.2195T>G)	3791delC (c.3659delC)
Y122X (c.366T>A)	L467P (c.1400T>C)	2347delG (c.2215delG)	3849+10kbC>T (c.3717+12191C>T)
574delA (c.442delA)	1548delG (c.1418delG) [†]	R764X (c.2290C>T)	G1244E (c.3731G>A)
621+1G>T (c.489+1G>T)	S489X (c.1466C>A)	2585delT (c.2453delT)	3876delA (c.3744delA)
663delT (c.531delT)	S492F (c.1475C>T)	E822X (c.2464G>T)	S1251N (c.3752G>A)
G178R (c.532G>A)	Q493X (c.1477C>T)	2622+1G>A (c.2490+1G>A)	3905insT (c.3773_3774insT)
711+1G>T (c.579+1G>T)	I507del (c.1519_ 1521delATC)	E831X (c.2491G>T)	W1282X (c.3846G>A)
711+3A>G (c.579+3A>G)	F508del (c.1521_ 1523delCTT)	W846X (c.2537G>A)	4005+1G>A (c.3873+1G>A)
711+5G>A (c.579+5G>A)	1677delTA (c.1545_ 1546delTA)	R851X (c.2551C>T)	4016insT (c.3884_3885insT)
712-1G>T (c.580-1G>T)	V520F (c.1558G>T)	2711delT (c.2583delT)	N1303K (c.3909C>G)
H199Y (c.595C>T)	Q525X (c.1573C>T) [†]	2789+5G>A (c.2657+5G>A)	Q1313X (c.3937C>T)
P205S (c.613C>T)	1717-8G>A (c.1585-8G>A)	Q890X (c.2668C>T)	4209TGTT>AA (c.4077_ 4080delTGTTinsAA)
L206W (c.617T>G)	1717-1G>A (c.1585-1G>A)	L927P (c.2780T>C)	CFTRdele22,23 (c.3964-78_ 4242+577del)
Q220X (c.658C>T)	G542X (c.1624G>T)	S945L (c.2834C>T)	4382delA (c.4251delA)

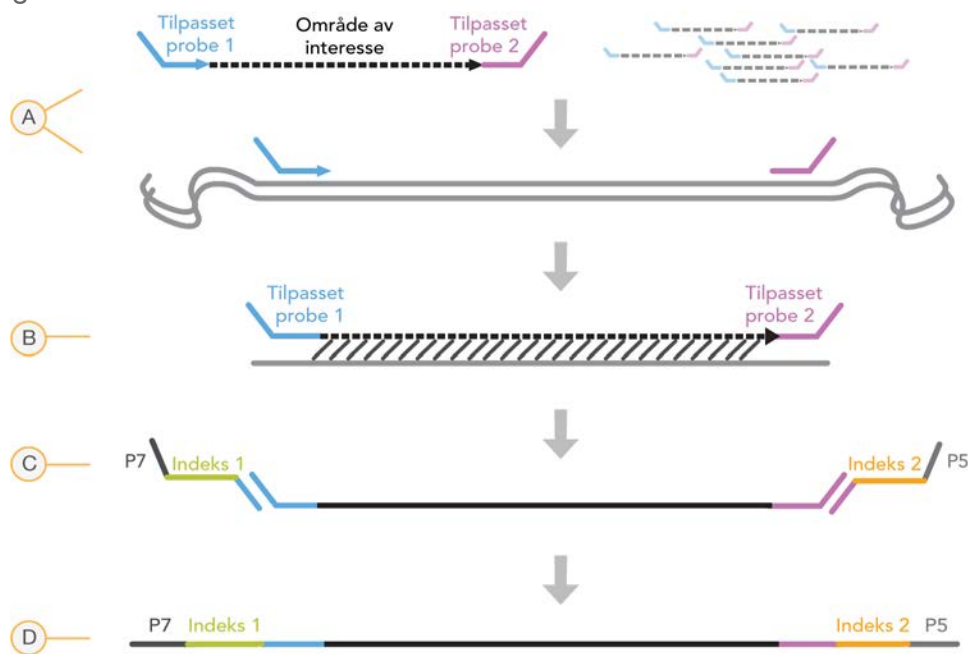
852del22 (c.720_741delAGGGAGAATGATGATGAAGTAC)	S549R (c.1645A>C)	3007delG (c.2875delG)	<i>PolyTG/PolyT</i>
1078delT (c.948delT)	S549N (c.1646G>A)	G970R (c.2908G>C)	<i>I506V (c.1516A>G)</i>
G330X (c.988G>T)	S549R (c.1647T>G)	3120G>A (c.2988G>A)	<i>I507V (c.1519A>G)</i>
R334W (c.1000C>T)	G551D (c.1652G>A)	3120+1G>A (c.2988+1G>A)	<i>F508C (c.1523T>G)</i>
I336K (c.1007T>A)	Q552X (c.1654C>T)	3121-1G>A (c.2989-1G>A)	

[†] Klassifisert i CFTR2-databasen¹² som en CF-fremkallende variant, mens Sosnay-avhandlingen¹³ klassifiserer varianten som ubestemt. Databaseklassifiseringen er mer aktuell og avspeiler den fullførte funksjonelle testingen, som ikke var tilgjengelig da Sosnay-publikasjonen fant sted.

Prosedyreprinsipper

Illumina MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalysen omfatter to hovedprosedyrer. Den første er å klargjøre prøvene for sekvensering, som kalles bibliotekklargjøring. Klargjøring av bibliotek består av fire hovedtrinn: hybridisering, ekstensjonsligasjon, PCR-forsterkning og biblioteknormalisering. Den andre prosedyren er å sekvensere den klargjorte prøven ved hjelp av SBS (sekvensering ved syntese)-kemi på MiSeqDx.

Bibliotekklargjøring



- A Hybridisering** – Det første trinnet, hybridisering, hybridiserer en pool med oppstrøms- og nedstrøms-oligonukleotider som er spesifikke for MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse til den genomiske DNA-prøven. På slutten av denne prosessen vil en tretrinns vaskeprosedyre med et filter som kan velge størrelse, fjerne ubundne oligonukleotider fra det genomiske DNA.
- B Ekstensjonsligasjon** – Det andre trinnet, ekstensjonsligasjon, forbinder hybridiserte oppstrøms- og nedstrøms-oligonukleotider. En DNA-polymerase strekker seg fra oppstrøms-oligonukleotider gjennom målregionen, fulgt av ligasjon til 5'-enden på nedstrøms-oligonukleotiden med en DNA-ligase. Resultatet er dannelsen av produkter som inneholder de CF-spesifikke oligonukleotidene, flankert av sekvenser som kreves for forsterkning.

- C **PCR-forsterkning** – Det tredje trinnet, PCR-forsterkning, forsterker ekstensjonsligasjonsproduktene ved hjelp av primere som tilfører indekssekvenser for prøvemultipleksing, i tillegg til adaptore som kreves for klyngegenerering på MiSeqDx. På slutten av denne prosessen vil en PCR-rengjøringsprosedyre rense PCR-produktene (kalt et bibliotek).
- D **Biblioteknormalisering** – Det siste trinnet, biblioteknormalisering, normaliserer kvantiteten i hvert bibliotek for å sørge for mer lik bibliotekrepresentasjon i det endelige sammensatte biblioteket. I slutten av denne prosessen, lastes det sammensatte biblioteket på MiSeqDx for sekvensering ved hjelp av SBS-kjemi.

Sekvensering

SBS-kjemi bruker en reversibel terminator metode for å detektere enkle nukleotidbaser idet de blir inkorporert i voksende DNA-strenger. Under hver sekvenseringssyklus blir en enkel fluorescensmerket deoksynukleosid trifosfat (dNTP) tilført nukleinsyrekjeden. Nukleotidmerkingen fungerer som en terminator for polymerisering, slik at etter hver dNTP-inkorporering, blir det fluorescerende fargestoffet avbildet for å identifisere basen og deretter enzymatisk spaltet for å gjøre det mulig å inkorporere den neste nukleotiden. På grunn av at alle fire reversible terminatorbundne dNTP-er (A, G, T, C) er tilstede som enkle, separate molekyler, vil den naturlige konkurransen minimere inkorporeringsavvik. Basebetegnelser gjøres direkte fra signalintensitetsmålingene under hver sekvenseringssyklus. Resultatet er base-for-base-sekvensering.

Dataanalyse

Det første trinnet i dataanalyse kalles primæranalyse. Denne prosessen utføres av programvare for analyse i sanntid (Real Time Analysis – RTA) og genererer basebetegnelser og kvalitetsscoreing. I det neste trinnet, som kalles sekundæranalyse, behandles basebetegnelser som ble generert under primæranalysen for å gi informasjon om hver prøve. Sekundæranalyse utføres av MiSeq Reporter- eller Local Run Manager-programvare, og omfatter demultipleksing, FASTQ-filgenerering, innretting, variantbetegnelse og generering av VCF-filer som inneholder informasjon om varianter som finnes i spesifikke posisjoner i referansegenomet.

MiSeq Reporter og Local Run Manager har identisk funksjonalitet for prøveanalyse og rapportering. Hovedforskjellen mellom de to er metodene som brukes for å danne grensesnittet med MiSeqDx-instrumentet. Du finner mer informasjon om forskjellene og om hvordan du bestemmer hvilken programvare som er i bruk under [MiSeqDx-instrumentgrensesnittmetoder på side 6](#).

- **Demultipleksing** – Hvis kjøringen inneholder flere prøver og den har indeksavlesinger, er dette det første trinnet i sekundæranalysen. Demultipleksing atskiller data fra sammenslåtte prøver, basert på de unike sekvensindeksene som ble tilføyd under PCR-forsterkningstrinnet.
- **FASTQ-filgenerering** – Etter demultipleksing genererer MiSeq Reporter eller Local Run Manager mellomliggende filer i FASTQ-formatet, som er et tekstformat som brukes til å representere sekvenser. FASTQ-filer inneholder avlesingene for hver prøve og kvalitetsscorene, uten avlesinger fra eventuelle klynger som ikke passerer filteret.
- **Innretting** – Sammenligner sekvenser mot referansen for å identifisere et forhold mellom sekvenser, og tildeler en score basert på likhetsområder. Innrettede avlesinger skrives til filer i BAM-format. For MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalysen utfører en bundet Smith-Waterman-algoritme lokale sekvensinnrettinger for å bestemme lignende regioner mellom to sekvenser.
- **Variantbetegnelse** – Dette trinnet registrerer enkle nukleotidvarianter (SNV), innsettinger og slettinger (indels) og andre strukturvarianter i en standardisert tekstfil kalt MiSeqDxCF139VariantAssay.txt.

Du finner mer informasjon om analysearbeidsprosessen i veiledningene for analyseprogramvaren som er installert med MiSeqDx. Du finner informasjon om MiSeq Reporter i *Referanseveiledning for MiSeq Reporter-programvaren (dokumentnr. 15038356)*. Du finner informasjon om Local Run Manager i *Referanseveiledning for Local Run Manager-programvaren for MiSeqDx (dokumentnr. 1000000011880)* og *Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager CF 139-variantanalysemodulen (dokumentnr. 1000000012184)*.

MiSeqDx-instrumentgrensesnittmetoder

Det finnes to forskjellige metoder for MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalysen å danne grensesnittet med MiSeqDx-instrumentet. Den opprinnelige metoden for å danne grensesnittet bruker MiSeq Reporter-programvare sammen med Illumina Worklist Manager (IWM) og Illumina User Management-programvare. Den nye metoden bruker Local Run Manager-programvare.

MiSeq Reporter og Local Run Manager har identisk funksjonalitet for prøveanalyse og rapportering.

Programvarefunksjoner	Opprinnelig	Ny
Opprette en kjøring for MiSeqDx-instrumentet	Illumina Worklist Manager (IWM)	Local Run Manager
Prøveoppsett og -sporing	Illumina Worklist Manager (IWM)	Local Run Manager
Styre brukertilgang	Illumina User Management Software	Local Run Manager
Utføre sekundæranalyse	MiSeq Reporter	Local Run Manager
Generere rapporter	MiSeq Reporter	Local Run Manager

Bestem om Local Run Manager er i bruk ved å følge disse trinnene.

- 1 Oppnå ekstern tilgang til MiSeqDx-instrumentet.
- 2 Logg deg på når du blir bedt om det.
- 3 Kontroller at "Local Run Manager" vises øverst i skjermbildet.



MERK

Hvis du ikke blir bedt om å logge deg på når du oppnår ekstern tilgang til instrumentet, er MiSeq Reporter i bruk.

Prosedyremessige begrensninger

- 1 Til *in vitro*-diagnostisk bruk. Resultatene som oppnås ved hjelp av Illumina MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalysen skal brukes og tolkes i forbindelse med en fullstendig klinisk evaluering.
- 2 Analysen er utformet for å identifisere en spesifikk delmengde med kjente varianter i *CFTR*-genet, men inkluderer ikke alle variantene som er identifisert i *CFTR*-genet. Spesifikt rapporterer analysen kun endringer i aminosyrenivåer hvis disse er forbundet med nukleotidendringene som oppført i [Tabell 2](#). Selv om andre nukleotidnivåendringer kan føre til samme endringer i aminosyrenivå, vil ikke disse bli rapportert av analysen. Selv om en variant ikke har blitt identifisert, garanterer ikke dette at andre *CFTR*-varianter ikke er tilstede i prøvene som analyseres.
- 3 Varianter identifisert av denne analysen varierer i frekvens blant ulike befolkninger.
- 4 Som ved all hybridiseringsbasert analyse kan underliggende polymorfismer eller varianter i oligonukleotidbindende områder innvirke på alleler som blir sondert, og derfor også på påvisningene som blir utført.
- 5 Analysen kan ikke bestemme om orienteringen til PolyTG/PolyT-varianten er i cis/trans mot R117H-varianten. For pasienter med en R117H-variant, bør det utføres ytterligere testing for å bestemme om en PolyTG/PolyT-variant, som kan påvirke den kliniske fenotypen [det vil si 12-13 (TG) eller 5T], er i en cis/trans-orientering i forhold til R117H-varianten.
- 6 PolyTG/PolyT er homopolymerregioner som er kjent for å være vanskelig å tolke med sekvensbaserte analyser på grunn av polymerasemangel. En 0,9 % (4/448) feilpåvisningsfrekvens ble observert for PolyTG/PolyT-resultater som viste et ± 1 TG-avvik, sammenlignet med Sanger-toveissekvensering ([Tabell 18](#)).

Produktkomponenter

Illumina MiSeqDx-plattformen omfatter:

- MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse (katalognr. DX-102-1004 eller DX-102-1003)
- MiSeqDx-instrumentet (katalognr. DX-410-1001)

Reagenser

Reagenser som følger med

Reagenser for Illumina MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalysen leveres av Illumina. Katalognr. DX-102-1003 har blitt konfigurert for 20 kjøringar med maksimum 48 prøver per kjøring (opptil 960 prøver totalt). Katalognr. DX-102-1004 har blitt konfigurert for to kjøringar med maksimum 48 prøver per kjøring (opptil 96 prøver totalt).

MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse, boks 1

Tabell 3 Boks 1A Preforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet		Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaring
	DX-102-1003	DX-102-1004			
CF 139-variantanalyse-oligopool	10 rør	1 rør	600 µl	Bufret vandig løsnings som inneholder oligonukleotider rettet mot <i>CFTR</i> -genet	-25 °C til -15 °C
Hybridiseringsbuffer	10 rør	1 rør	4,32 ml	Bufret vandig løsnings som inneholder salter og formamid	-25 °C til -15 °C
Ekstensjonsligasjonsblanding	10 rør	1 rør	4,8 ml	Bufret vandig løsnings som inneholder proprietær blanding av DNA-polymeraser, DNA-ligase og dNTP-er	-25 °C til -15 °C
Indeksprimere A (A501) – H (A508)	10 rør per primer	1 rør per primer	192 µl	PCR-primere med indekssekvenser og sekvenseringsadaptore	-25 °C til -15 °C
Indeksprimere 1 (A701) – 12 (A712)	10 rør per primer	1 rør per primer	128 µl	PCR-primere med indekssekvenser og sekvenseringsadaptore	-25 °C til -15 °C
PCR-polymerase	10 rør	1 rør	56 µl	Proprietær DNA-polymerase	-25 °C til -15 °C
PCR-hovedblanding	10 rør	1 rør	2,8 ml	Bufret vandig løsnings som inneholder salter og dNTP-er	-25 °C til -15 °C

Tabell 4 Boks 1B Postforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet		Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaring
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Biblioteknormaliseringsfortynning	10 rør	1 rør	4,6 ml	Bufret vandig løsnings som inneholder salter, 2-mercaptoetanol og formamid	-25 °C til -15 °C
Bibliotekfortynningsbuffer	10 rør	1 rør	4,5 ml	Bufret vandig løsnings	-25 °C til -15 °C

Komponent	Kvantitet		Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaring
	DX-102-1003	DX-102-1004			
PhiX-internkontroll	1 rør	1 rør	10 µl	Bufret vandig løsning som inneholder PhiX genomisk DNA	-25 °C til -15 °C

MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse, boks 2

Tabell 5 Boks 2 Postforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet		Innhold	Oppbevaring
	DX-102-1003	DX-102-1004		
MiSeqDx-reagenskassett – CF 139-variantanalyse	20 kassetter	2 kassetter	Engangskassett som inneholder reagenser for klyngegenerering og sekvensering for bruk med MiSeqDx, inkludert formamid, 2-mercaptoetanol og < 2 % DMSO	-25 °C til -15 °C

MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse, boks 3

Tabell 6 Boks 3A Preforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet		Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaring
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Stringent vaskebuffer	10 flasker	1 flaske	24 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter, 2-mercaptoetanol og formamid	2°C til 8°C
Universalvaskebuffer	10 rør	1 rør	4,8 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter	2°C til 8°C

Tabell 7 Boks 3B Postforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet		Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaring
	DX-102-1003	DX-102-1004			
PCR-rengjøringskuler	10 rør	1 rør	5 ml	Bufret vandig løsning som inneholder fast fase-paramagnetiske kuler og polyetylen glykol	2°C til 8°C
Vaskeløsning for biblioteknormalisering	20 rør	2 rør	4,8 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter, 2-mercaptoetanol og formamid	2°C til 8°C
Bibliotek kuler	10 rør	1 rør	1,2 ml	Bufret vandig løsning som inneholder fast fase-paramagnetiske kuler	2°C til 8°C
MiSeqDx-strømningscelle – CF 139-variantanalyse	20 beholdere	2 beholdere	1 strømningscelle	Glassubstrat med kovalent bundne oligonukleotider	2°C til 8°C

MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse, boks 4

Tabell 8 Boks 4 Postforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet		Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaring
	DX-102-1003	DX-102-1004			
MiSeqDx SBS-oppløsning (PR2) – CF 139-variantanalyse	20 flasker	2 flasker	353,1 ml	Bufret vandig løsning	2°C til 8°C

MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse, boks 5

Tabell 9 Boks 5 Preforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet		Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaring
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Filterplate	20 plater	2 plater	N/A	Mikrotiterplate av polypropylen med en modifisert polyetersulfon-membran	15°C til 30°C

Tabell 10 Boks 5 Postforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet		Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaring
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Elueringsbuffer	10 rør	1 rør	4,8 ml	Bufret vandig løsning	15°C til 30°C
Biblioteklagringsbuffer	10 rør	1 rør	3,5 ml	Bufret vandig løsning	15°C til 30°C

Reagenser som er påkrevd, men som ikke følger med

Preforsterkningsreagenser

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

Postforsterkningsreagenser

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

Oppbevaring og håndtering

- 1 Romtemperatur defineres som 15 °C til 30 °C.
- 2 Følgende reagenser blir sendt i frossen tilstand og er stabile når de lagres ved –25 °C til –15 °C inntil den angitte utløpsdatoen.
 - CF 139-variantanalyse-oligopool
 - Hybridiseringsbuffer
 - Ekstensjonsligasjonsblanding
 - Indeksprimere A (A501) – H (A508)
 - Indeksprimere 1 (A701) – 12 (A712)

- PCR-polymerase
- PCR-hovedblanding
- Biblioteknormaliseringsfortynning
- Bibliotekfortynningsbuffer
- PhiX-internkontroll
- MiSeqDx-reagenskasset – CF 139-variantanalyse

Bortsett fra reagenskassetten er reagensene stabile i maksimalt 6 fryse/tine-sykluser som utføres før den angitte utløpsdatoen.

Reagenskassetten skal ikke fryses på nytt etter å ha vært opptint. Den kan oppbevares i opptil 6 timer ved 2 °C til 8 °C.

- 3 Følgende reagenser blir sendt nedkjølt og er stabile når de lagres ved 2 °C til 8 °C inntil den angitte utløpsdatoen.
 - Stringent vaskebuffer
 - Universalvaskebuffer
 - PCR-rengjøringskuler
 - Bibliotekkuler
 - Vaskeløsning for biblioteknormalisering
 - MiSeqDx SBS-oppløsning (PR2) – CF 139-variantanalyse
 - MiSeqDx-strømningscelle – CF 139-variantanalyse
- 4 Følgende reagenser blir sendt i omgivelsestemperatur og er stabile når de lagres ved romtemperatur inntil den angitte utløpsdatoen:
 - Elueringsbuffer
 - Filterplate
 - Biblioteklagringsbuffer
- 5 Endringer i de leverte reagensenes fysiske utseende kan indikere nedbryting av materialene. Hvis det forekommer endringer i det fysiske utseendet (for eksempel åpenbare endringer i reagensfarge eller uklarhet sammen med mikrobiell kontaminasjon), skal ikke reagensene brukes.
- 6 Hybridiseringsbuffer-, stringent vaskebuffer- og biblioteknormaliseringsfortynningsreagenser kan danne synlig bunnfall eller krystaller. Før de brukes, skal de roteres kraftig og deretter kontrolleres visuelt for å påse at det ikke er bunnfall til stede.
- 7 Følg denne beste praksisen når du håndterer PCR-rengjøringskuler og bibliotekkuler:
 - Kulene skal aldri fryses.
 - La kulene få romtemperatur.
 - Umiddelbart før bruk skal kulene roteres til de er godt suspendert og fargen er homogen.
 - Bland prøven grundig etter at kulene er tilsatt ved å pipettere opp og ned 10 ganger. En ryster kan brukes til grundig blanding av prøver.
 - Inkuber kule/prøve-blandingen i romtemperatur i hele den angitte tiden.
 - Følg instruksjonene når du bruker magnetstativet. Vent til oppløsningen er klar før du aspirerer. La platen ligge på magnetstativet mens supernatanten aspireres langsomt, og vær nøye med å ikke bevege de atskilte kulene.
- 8 PCR-forsterkningsplaten kan forbli på termosyklere over natten, eller den kan oppbevares ved 2 °C til 8 °C i opptil 2 dager. Før platen settes til oppbevaring ved 2 °C til 8 °C, skal den forsegles godt.
- 9 Ikke frys bibliotekkulene, og ikke bland dem med biblioteknormaliseringsfortynningsreagenset hvis de ikke skal brukes umiddelbart.
- 10 Det fortynnedeamplikonbiblioteket kan oppbevares ved –25 °C til –15 °C i opptil 14 dager.
- 11 Last inn fortynnet sammensatt amplikon på reagenskassetten etter denaturering.

Utstyr og materiell

Utstyr og materialer som følger med, selges separat

- 1 **MiSeqDx-instrumentet**, katalognr. DX-410-1001
- 2 **TruSeq Index Plate Fixture Kit**, katalognr. FC-130-1005
- 3 **TruSeq Index Plate Fixture & Collar Kit**, katalognr. FC-130-1007
- 4 **Utskiftingshetter for indeksadapter**, katalognr. DX-502-1003

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

Utstyr og materialer til preforsterkning

- 1 **Varmeblokk** – Én varmeblokk for 96-brønners plate er påkrevd. Varmeblokken skal oppfylle følgende ytelsesspesifikasjoner. Varmeblokker med oppvarmede lokk er godtatt for bruk.
 - Temperaturområde: Omgivelse +5 °C til 99 °C
 - Temperaturregulering: ± 0,1 °C ved 37 °C, ± 0,4 °C ved 60 °C
- 2 **Prøveinkubator** – Én inkubator (hybridiseringsovn) er påkrevd. Inkubatoren skal oppfylle følgende ytelsesspesifikasjoner.
 - Temperaturområde: 10 °C til 100 °C
 - Temperaturregulering: ± 0,2 °C
- 3 **Bordsentrifuge** – Én temperaturstyrt bordsentrifuge med kapasitet til å opprettholde 20 °C er påkrevd. (En separat sentrifuge er påkrevd i postforsterkningsområdet.) Alle platesentrifuger som passer til en 96-brønners plate med filterenhet og når tilordnede hastigheter i protokollen (280 til 2400 × g), er akseptable.
- 4 **Presisjonsdråpetellere** – Ett sett med presisjonsdråpetellere er påkrevd. (Et separat sett er påkrevd i postforsterkningsområdet.) Bruk av presisjonsdråpetellere er påkrevd for å sikre nøyaktig reagens- og prøvetilførsel. Dråpetellere med enkel kanal eller flere kanaler kan brukes hvis de blir kalibrert regelmessig og er nøyaktige innen 5 % av oppgitt volum.
- 5 **Forbruksmateriell** – Følgende forbruksmateriell er påkrevd.
 - 96-brønners PCR-plater med kant, 0,2 ml, polypropylen eller tilsvarende
 - 96-brønners oppbevaringsplater, 0,8 ml (MIDI-plater)
 - Oppløsningsbeholder, PVC, DNase, RNase-fri (kar)
 - Klebende aluminiumsfolieforsegling
 - Passende PCR-plateforsegling
 - Aerosolmotstandige dråpetellerspisser

Utstyr og materialer til postforsterkning

- 1 **Termosykler** – Én termosykler er påkrevd. Termosykleren skal ha et oppvarmet lokk og oppfylle følgende ytelsesspesifikasjoner:
 - Temperaturkontrollområde: 4 °C til 99 °C
 - Kontrollnøyaktighet: ± 0,25 °C fra 35 °C til 99 °C
- 2 **Mikroplateryster** – Én mikroplateryster er påkrevd i bibliotekets postforsterkningsområde. Platerysteren skal oppfylle følgende ytelsesspesifikasjoner:
 - Maks. blande-hastighet: 3000 o/min
 - Blande-hastighetsområde: 200 til 3000 o/min
- 3 **Bordsentrifuge** – Én bordsentrifuge med kapasitet til å opprettholde 20 °C er påkrevd. (En separat sentrifuge er påkrevd i preforsterkningsområdet.) Alle platesentrifuger som når tilordnede hastigheter i protokollen (280 til 2400 × g) er akseptable.
- 4 **Varmeblokk** – Én varmeblokk for rør er påkrevd. Varmeblokken skal oppfylle følgende ytelsesspesifikasjoner.
 - Temperaturområde: Omgivelse +5 °C til 99 °C
 - Temperaturregulering: ± 0,1 °C ved 37 °C, ± 0,4 °C ved 60 °C

- 5 **Magnetstativ** – Ett magnetstativ for 96-brønners plate er påkrevd. Bedre ytelse oppnås når magnetene er på siden av stativet og ikke på bunnen.
- 6 **Presisjonsdråpetellere** – Ett sett med presisjonsdråpetellere er påkrevd. (Et separat sett er påkrevd i preforsterkningsområdet.) Bruk av presisjonsdråpetellere er påkrevd for å sikre nøyaktig reagens- og prøvetilførsel. Dråpetellere med enkel kanal eller flere kanaler kan brukes hvis de blir kalibrert regelmessig og er nøyaktige innen 5 % av oppgitt volum.
- 7 **Forbruksmateriell** – Følgende forbruksmateriell er påkrevd.
 - 96-brønners PCR-plater med kant, 0,2 ml, polypropylen eller tilsvarende
 - 96-brønners oppbevaringsplater, 0,8 ml (MIDI-plater)

**MERK**

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

- Kjegleformede rør, 15 ml
- Eppendorf-mikrosentrifugerør (skrukork anbefales)
- Åtterørs PCR-strimler
- Oppløsningsbeholdere, PVC, DNase, RNase-frie (kar)
- Klebende aluminiumsfolieforseglinger
- Klebende plateforseglinger for engangsbruk
- Aerosolmotstandige dråpetellerspisser

Prøvetaking, transport og oppbevaring

**MERK**

Håndter alle prøver som om de er potensielt smittefarlige stoffer.

- 1 Fullblodsprøver tatt i K₂EDTA-rør kan brukes.
- 2 Fullblodsprøver kan oppbevares opptil 7 dager i romtemperatur, opptil 30 dager ved 2 °C til 8 °C, eller opptil 30 dager hvis de er frosset ved -25 °C til -15 °C.
- 3 Fullblod kan transporteres i opptil 7 dager i romtemperatur, 30 dager ved 2 °C til 8 °C, eller 30 dager hvis det er frosset ved -25 °C til -15 °C. Transport av fullblod skal overholde statlige og lokale retningslinjer for transport av etiologiske midler.
- 4 Det ble ikke observert ugunstig virkning på analyseytelsen når genomisk DNA ble gjenstand for 6 fryse/tine-sykluser.
- 5 Det ble ikke observert ugunstig virkning på analyseytelsen med fullblodsprøver med elevert bilirubin, kolesterol, triglyserider, EDTA eller hvis hemoglobin var tilstede.

Advarsler og forholdsregler

**FORSIKTIG**

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

- 1 **Enkelte komponenter i denne analysen inneholder potensielt farlige kjemikalier. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk verneutstyr, inkludert vernebriller, hansker og laboratoriefrakk som er egnet ved risiko for eksponering. Brukte reagenser skal behandles som kjemisk avfall og kastes i samsvar med gjeldende regionale, nasjonale og lokale lover og forskrifter.** Hvis du ønsker ytterligere informasjon om helse, miljø og sikkerhet, kan du se support.illumina.com/sds.html. (Du finner mer informasjon under [Reagenser på side 7.](#))
- 2 Noen av komponentene i denne analysen inneholder 2-merkaptoetanol, et reduseringsmiddel. (Du finner mer informasjon under [Reagenser på side 7.](#)) Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Brukes i et godt ventilert område og eventuelle beholdere og ubrukt innhold skal kasseres i samsvar med gjeldende lokale, statlige sikkerhetsstandarder. For mer informasjon, kontakt Illuminas tekniske støtte.

- 3 Håndter alle prøver som om de er potensielt smittefarlige stoffer.
- 4 Hvis du unnlater å følge prosedyrene som beskrevet, kan det resultere i feil resultater eller betydelig reduksjon i prøve kvaliteten.
- 5 Bruk rutinemessige forholdsregler for laboratoriet. Ikke pipetter med munnen. Ikke spis, drikk eller røyk i tilordnede arbeidsområder. Bruk engangshansker og laboratoriefrakker når du håndterer prøver og analysereagenser. Vask hendene grundig etter å ha håndtert prøvene og analysereagensene.
- 6 Ikke bruk noen analysekomponenter utover deres oppgitte utløpsdato på etiketten på analyseesken. Ikke bytt om analysekomponenter fra ulike analysevarepartier. Vær oppmerksom på at analysevarepartier er identifisert på etiketten på analyseesken.
- 7 Oppbevar analysekomponentene ved angitt temperatur i tilordnede preforsterknings- og postforsterkningsområder.
- 8 Gjentatte fryse/tine-sykluser (opptil 6) i Boks 1-komponenter vil ikke ødelegge analysens intakthet.
- 9 For å hindre nedbrytning av prøver eller reagens må det påses at all natriumhypokloritt damp er fullstendig oppløst før protokollen startes.
- 10 God laboratoriepraksis og god laboratoriehigiene er påkrevd for å hindre at PCR-produkter kontaminerer reagenser, instrumentering og genomiske DNA-prøver. PCR-kontaminasjon kan medføre unøyaktige og upålitelige resultater.
- 11 For å hindre kontaminasjon må du påse at preforsterknings- og postforsterkningsområdene har sitt eget utstyr (som dråpetellere, dråpetellerspisser, roterer og sentrifuge).
- 12 Unngå krysskontaminasjon. Bruk nye dråpetellerspisser mellom prøvene og mellom dispensering av reagenser. Bland prøver med en dråpeteller og sentrifuger platen når dette angis. Ikke roter platene. Bruk av aerosolresistente spisser reduserer risikoen for amplikon-overføring og krysskontaminasjon fra prøve til prøve.
- 13 Indeks-prøvesammenkobling må samsvare med prøveinformasjon som er oppgitt for MiSeqDx-kjøringen. Misforhold mellom prøveinformasjonen og plateoppsettet vil resultere i tap av positiv prøveidentifikasjon og uriktig resultatrapportering.
- 14 Tilbered alltid ny 80 % etanol for vasketrinnene. Etanol kan absorbere vann fra luften, noe som påvirker resultatene.
- 15 Sørg for at all etanol blir fjernet fra bunnen av brønnene under vasketrinnene. Rester av etanol kan påvirke resultatene.
- 16 Følg de angitte tørketidene etter magnetstativtrinnet for å sikre fullstendig fordamping. Rester av etanol kan påvirke ytelsen til påfølgende reaksjoner.
- 17 Ikke bland CF 139-variantanalyse-oligopool og hybridiseringsbuffer før oppbevaring. Når de kombineres, blir CF 139-variantanalyse-oligopool ustabil, selv ved oppbevaring i frosset tilstand.
- 18 Bruk av termosyklere med aktiv avkjøling (f.eks. Peltier, termoelektrisk avkjølt) anbefales ikke for hybridiseringstrinnet. Det passive nedkjølingstrinnet er kritisk for riktig hybridisering.
- 19 Tilsett alltid PCR-polymerase til PCR-hovedblandingen like før bruk. Kombinert arbeidsoppløsning skal aldri oppbevares.
- 20 Under biblioteknormaliseringstrinnet er det ekstremt avgjørende å resuspendere bibliotekkulpeletten fullstendig. Dette er avgjørende for å oppnå klyngetetthet på MiSeqDx-strømningscellen.
- 21 Følg de oppgitte inkubasjonstidene i biblioteknormaliseringstrinnet. Feil inkubasjon kan påvirke bibliotekrepresentasjonen og klyngetettheten.
- 22 På grunn av antallet plateoverføringer og derved mulighet for kontaminasjon, bør du være ekstremt forsiktig for å sikre at brønninnholdet forblir fullt ut i brønnen. Innholdet skal ikke sprute.
- 23 Anbefalingen på 250 ng DNA-innmating gir rom for variasjoner i DNA-kvantiteten, analyseytelsen blir drevet av dette innmatingsnivået.
- 24 Prøvevarianter med betegnelsen «No Call» (Ingen påvisning) på testrapporten angir at dataene for denne variantposisjonen ikke oppfylte definerte sekvenseringsterskler. Varianter med betegnelsen «No Call» (Ingen påvisning) skal ikke rapporteres med mindre gjentatt testing gir verdier som oppfyller definerte terskler og ikke lenger har betegnelsen «No Call» (Ingen påvisning).

Akronymer

Tabell 11 Akronymer for Illumina MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse

Akronym	Definisjon
AMP	AMplification Plate (Forsterkningsplate)
CLP	CLean-up Plate (Rengjøringsplate)
DAL	Diluted Amplicon Library (Fortynnet amplikonbibliotek)
FPU	Filter Plate Unit (Filterplateenhet)
HYB	HYBridization Plate (Hybridiseringsplate)
LNP	Library Normalization Plate (Biblioteknormaliseringsplate)
NTC	No Template Control (Ingen malkontroll)
PAL	Pooled Amplicon Library (Sammensatt amplikonbibliotek)
SGP	StoraGe Plate (Oppbevaringsplate)

Prosedyremessige merknader

- 1 Illumina krever at én positiv kontroll-DNA-prøve og en negativ kontroll (NTC eller Ingen mal-kontroll) er inkludert i hver kjøring, som defineres som et sett med prøver som behandles parallelt. Den positive kontroll-DNA-prøven skal være en godt karakterisert prøve med én eller flere kjente *CFTR*-varianter. Illumina anbefaler bruk av en villtypekontroll. Villtypekontrollen bør kjøres som en prøve og bør ikke erstatte den positive eller negative kontrollen.
- 2 Før du starter MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalysen, skal DNA ekstraheres og kvantifiseres.
- 3 Hvilken som helst validert DNA-ekstraksjonsmetode kan brukes.
- 4 Kvantifiser DNA med et spektrofotometer. Kontroller at A260/A280 for DNA-prøven er > 1,5. Normaliser DNA-prøven til 50 ng/μl. Hver prøve krever 5 μl genomisk DNA (totalt 250 ng).

Prøvegjenomløp og indeksfremstilling

For Illumina MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalysen kan prøvegjennomløpet per MiSeqDx-kjøring være mellom 8 og 48 prøver. Indekseringsprimerne som brukes under PCR-forsterkningen må være valgt på grunnlag av ønsket endelig prøvegjennomløp for å sikre diversitet i indekssekvensen.



MERK

For å oppnå maksimal gjennomløpseffektivitet utføres biblioteksklargjøring for opptil 96 prøver og deretter deles prøvene inn i to sekvenseringskjøringer med maksimalt 48 prøver hver. MiSeqDx kan kun sekvensere 48 prøver om gangen. For MiSeq Reporter oppretter du egne prøveark for hvert sett à 48 prøver. For Local Run Manager oppgir du prøveinformasjon for hvert sett à 48 prøver direkte inn i CF 139-variantanalysemodulen.

MiSeqDx bruker en grønn LED-lampe for å sekvensere G/T-baser og en rød LED-lampe for å sekvensere A/C-baser. For hver syklus må minst én av to nukleotider i hver fargekanal avleses for å sikre riktig registrering. Det er viktig å opprettholde fargebalansen for hver base av indeksavlesingen som sekvenseres, ellers kan det oppstå registreringsfeil under sekvensering av indeksavlesingen.

Se [Tabell 12](#) for å velge indeksprimerkombinasjoner for 48 eller 96 prøvebibliotekklargjøringer.

Tabell 12 Indeksprimerkombinasjoner for sekvenseringskjøringer med 48 prøver eller 96 prøver

Indeksprimere 1 (I7) sett 1 kolonne 1–6	Indeksprimere 1 (I7) sett 2 kolonne 7–12	Indeksprimere 2 (I5) rad A–H
Indeksprimer 1 (A701)	Indeksprimer 6 (A706)	Indeksprimer A (A501)
Indeksprimer 2 (A702)	Indeksprimer 7 (A707)	Indeksprimer B (A502)
Indeksprimer 3 (A703)	Indeksprimer 8 (A708)	Indeksprimer C (A503)
Indeksprimer 4 (A704)	Indeksprimer 9 (A709)	Indeksprimer D (A504)
Indeksprimer 5 (A705)	Indeksprimer 11 (A711)	Indeksprimer E (A505)
Indeksprimer 10 (A710)	Indeksprimer 12 (A712)	Indeksprimer F (A506)
--	--	Indeksprimer G (A507)
--	--	Indeksprimer H (A508)

Hvis det sekvenseres færre enn 48 prøver i en sekvenseringskjøring, velges de aktuelle indeksene basert på sine sekvenser for å opprettholde fargebalansen i de grønne og røde kanalene (se [Tabell 14](#) og [Tabell 15](#)). Som et minimum må kjøringene med 8 til 48 prøver inkludere indekseringsprimerkombinasjonene som identifiseres i [Tabell 13](#).

For å behandle mindre kjøringene på riktig måte må det være minst åtte prøver tilstede. Hvis seks unike prøver (ekskludert de positive og negative kontrollene) ikke er tilgjengelige, er det akseptabelt å fylle kjøringen med prøvereplikater eller enhver form for human genomisk DNA-prøve. Se [Tabell 13](#) for det minimale settet med fargebalanserte indekser til bruk ved sekvenseringskjøringer med 8 prøver.

Tabell 13 Indeksprimer-kombinasjonen for sekvenseringskjøringer med 8 prøver

	Indeksprimer 1 (A701)	Indeksprimer 2 (A702)	Indeksprimer 10 (A710)
Indeksprimer C (A503)	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3
Indeksprimer D (A504)	Prøve 4	Prøve 5	Prøve 6
Indeksprimer E (A505)	Prøve 7	Prøve 8	--

Indeksprimersekvenser

Tabell 14 Indeksprimere 1 (I7) sett 1 og sett 2

Indeksprimer	Sekvens
Indeksprimer 1 (A701)	ATCACGAC
Indeksprimer 2 (A702)	ACAGTGGT
Indeksprimer 3 (A703)	CAGATCCA
Indeksprimer 4 (A704)	ACAAACGG
Indeksprimer 5 (A705)	ACCCAGCA
Indeksprimer 6 (A706)	AACCCCTC
Indeksprimer 7 (A707)	CCCAACCT
Indeksprimer 8 (A708)	CACCACAC
Indeksprimer 9 (A709)	GAAACCCA
Indeksprimer 10 (A710)	TGTGACCA
Indeksprimer 11 (A711)	AGGGTCAA
Indeksprimer 12 (A712)	AGGAGTGG

Tabell 15 Indeksprimere 2 (I5)

Indeksprimer	Sekvens
Indeksprimer A (A501)	TGAACCTT
Indeksprimer B (A502)	TGCTAAGT
Indeksprimer C (A503)	TGTTCTCT
Indeksprimer D (A504)	TAAGACAC
Indeksprimer E (A505)	CTAATCGA
Indeksprimer F (A506)	CTAGAACA
Indeksprimer G (A507)	TAAGTTCC
Indeksprimer H (A508)	TAGACCTA

Bruksanvisning

Oppgi kjøringinformasjon

MiSeq Reporter og Local Run Manager er de to programvarealternativene som er tilgjengelige for oppsett av en cystisk fibrose 139-variantanalysekjøring.

Hvis du bruker MiSeq Reporter-programvare, genererer du et prøveark ved hjelp av Illumina Worklist Manager.

Hvis du bruker Local Run Manager-programvaren, finnes det ikke et eget prøveark. Oppgi informasjon om kjøring og prøveoppsett direkte inn i Local Run Manager CF 139-variantanalysemodulen.

Du finner mer informasjon om forskjellene mellom MiSeq Reporter og Local Run Manager under [MiSeqDx-instrumentgrensesnittmetoder](#) på side 6.

Bruke Illumina Worklist Manager (IWM)

Klargjøre prøveark i MiSeqDx

- 1 Velg **Create Worklist** (Opprett arbeidsliste) fra velkomstskjermbildet i Illumina Worklist Manager.
- 2 I feltet Test Type (Testtype) velger du **CF 139-Variant Assay** (CF 139-variantanalyse).
- 3 Oppgi et navn på prøvearket i feltet Worklist Name (Arbeidslistenavn).
 - Hvis den alfanumeriske strekkode-ID-en på reagenskassetten brukes som prøvearknavn, vil MiSeq Operating Software (MOS) finne prøvearket automatisk.
 - Hvis andre navn brukes for prøvearket, kan knappen **Browse** (Bla gjennom) i MiSeq Operating Software (MOS) brukes for å finne det aktuelle prøvearket.
- 4 **[Valgfritt]** Gi en beskrivelse for å identifisere kjøringen.
- 5 Sørg for at datoen stemmer overens med startdatoen på kjøringen.
- 6 Velg **Next** (Neste).

Oppgi prøveinformasjon

- 1 Fra fanen Table (Tabell) eller Plate, oppgi følgende informasjon for hver brønn som inneholder prøve:
 - a **Sample ID** (Prøve-ID) – Oppgi en unik prøve-ID.
 - b **Index 1 and Index 2** (Indeks 1 og Indeks 2) – Angi indeksadapteren som skal brukes for hver indeksavlesing.
- 2 **[Valgfritt]** Hvis du vil registrere mer detaljert informasjon om prøvene, kan du oppgi et prøvenavn og beskrivelse.

- 3 [Valgfritt] Du kan identifisere kontroller på platen ved å velge Negative (Negativ) eller Positive (Positiv) fra nedtrekksmenyen **Control** (Kontroll).
- 4 Gå til fanen Plate Graphic (Plategrafikk) og bruk alternativet **Copy to Clipboard** (Kopier til utklippstavle) eller **Print** (Skriv ut) for å ta et bilde av prøveplaten.
- 5 Velg **Finish** (Fullfør). Når du lagrer prøvearket, oppretter programvaren både en .csv- og .png-fil for plategrafikken automatisk og lagrer dem i samme plassering for bruk med eksperimentoppsett.

**MERK**

Bruk Illumina Worklist Manager kun når du skal redigere prøvearkinformasjon. Hvis du redigerer andre steder enn i Illumina Worklist Manager, kan kjøringen eller analysen mislykkes.

Bruke Local Run Manager CF 139-variantanalysemodulen

Angi parametere


- 1 Logg deg på Local Run Manager.
- 2 Klikk på **Create Run** (Opprett kjøring), og velg **CF 139**.
- 3 Oppgi et kjøringsnavn som identifiserer kjøringen fra sekvensering til og med analyse.
Bruk alfanumeriske tegn, mellomrom, understreker eller bindestreker.
- 4 [Valgfritt] Oppgi en kjøringsbeskrivelse for å identifisere kjøringen.
Bruk alfanumeriske tegn.

Angi prøver for kjøringen

Angi prøver for kjøringen ved hjelp av følgende alternativer:


- **Legge inn prøver manuelt**
 - 1 Velg antall prøver fra rullegardinmenyen Number of Samples (Antall prøver).
Ta hensyn til følgende informasjon når du foretar et valg.
 - Velg antall prøver som ligger nærmest antall prøver som du skal teste. Hvis nøyaktig antall prøver ikke finnes i listen, velger du det nærmeste antallet, men mindre enn antallet du skal teste, slik at kravene til indeksmangfold oppfylles. Hvis du for eksempel ønsker å teste 18 prøver, velger du 16 prøver. Deretter legger du til 2 prøver i tillegg. Husk å velge indeksadaptere for ekstra brønner.
 - 2 Bruk den tomme tabellen i skjermbildet Create Run (Opprett kjøring).
Foreslåtte prøvebrønner er uthevet.
- **Import samples** (Importer prøver) – Naviger til en ekstern fil i et format med kommaseparerte verdier (*.csv).
En mal er tilgjengelig for nedlasting i skjermbildet Create Run (Opprett kjøring).

Oppgi prøver manuelt

- 1 Oppgi et unikt prøvenavn i feltet Sample Name (Prøvenavn).
Bruk alfanumeriske tegn, bindestreker eller understreker.
- 2 Høyreklikk og velg positive og negative kontrollprøver.
- 3 [Valgfritt] Oppgi en prøvebeskrivelse i fanen Sample Description (Prøvebeskrivelse).
Bruk alfanumeriske tegn, bindestreker, understreker eller mellomrom.
- 4 [Valgfritt] Velg en indeks 1-adapter fra rullegardinlisten Index 1 (i7) (Indeks 1 (i7)).
Dette trinnet er valgfritt fordi i7- og i5-indekskombinasjonene som automatisk opptar de uthevede brønnene allerede oppfyller kravene til indeksmangfold.
- 5 [Valgfritt] Velg en indeks 2-adapter fra rullegardinlisten Index 2 (i5) (Indeks 2 (i5)).
Dette trinnet er valgfritt fordi i7- og i5-indekskombinasjonene som automatisk opptar de uthevede brønnene allerede oppfyller kravene til indeksmangfold.
- 6 Klikk på ikonet  **Print** (Skriv ut) for å vise plateoppsettet.
- 7 Velg **Print** (Skriv ut) for å skrive ut plateoppsettet som en referanse for klargjøring av biblioteker.

- 8 [Valgfritt] Klikk på **Export** (Eksporter) for å eksportere prøveinformasjon til en ekstern fil.
- 9 Klikk på **Save Run** (Lagre kjøring).

Importer prøver

- 1 Klikk på **Import Samples** (Importer prøver), og bla til prøveinformasjonsfilens plassering. Det finnes to typer filer du kan importere.
 - Opprett et nytt plateoppsett ved å klikke på **Template** (Mal). Malfilen inneholder de riktige kolonneoverskriftene for import. Oppgi prøveinformasjon i hver kolonne for prøvene i kjøringen. Slett eksempelinformasjon i ubrukte celler, og lagre deretter filen.
 - Bruk en fil med prøveinformasjon som ble eksportert fra CF 139-variantmodulen med funksjonen Export (Eksporter).
- 2 Klikk på ikonet  **Print** (Skriv ut) for å vise plateoppsettet.
- 3 Velg **Print** (Skriv ut) for å skrive ut plateoppsettet som en referanse for klargjøring av biblioteker.
- 4 Klikk på **Save Run** (Lagre kjøring).

Hybridisering av oligonukleotid-pool

Tilberedelse

- 1 La CF 139-variantanalyse-oligopool, hybridiseringsbuffer, genomiske DNA-prøver og positiv kontrollprøve nå romtemperatur.
- 2 Roter CF 139-variantanalyse-oligopool og hybridiseringsbuffer kraftig for å sikre at alt bunnfall er fullstendig oppløst, og deretter sentrifugeres rørene et øyeblikk for å samle væske.
- 3 Still inn en 96-brønners varmeblokk på 95 °C.
- 4 Forvarm en inkubator til 37 °C.
- 5 Sett opp prøveplaten i henhold til plategrafikkutskriften fra Illumina Worklist Manager eller Local Run Manager.

Prosedyre

- 1 Sett ut en ny 96-brønners PCR-plate (heretter kalt **HYB**-platen).
- 2 Tilsett 5 µl av prøven eller kontrollen til 50 ng/µl (250 ng totalt) til de aktuelle brønnene i **HYB**-platen. Følg det genererte plateoppsettet for riktig brønnvalg.
- 3 Tilsett 5 µl CF 139-variantanalyse-oligopool i alle prøvebrønner.
- 4 Tilsett 40 µl hybridiseringsbuffer i hver prøvebrønn i **HYB**-platen. Pipetter forsiktig opp og ned 3–5 ganger for å blande.
- 5 Forsegle **HYB**-platen, og sentrifuger ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 6 Legg **HYB**-platen på den forhåndsoppvarmede blokken ved 95 °C, og inkuber i 1 minutt.
- 7 Reduser varmeblokken til 40 °C, og fortsett å inkubere til varmeblokken når 40 °C (omtrent 80 minutter). Gradvis avkjøling er avgjørende for riktig hybridisering. PCR-termsyklere med aktiv avkjøling (for eksempel Peltier, termoelektrisk avkjølt) anbefales derfor ikke for denne prosessen.



SIKKERT STOPPEPUNKT

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

Fjerning av ubundne oligonukleotider

Tilberedelse

- 1 La ekstensjonsligasjonsblanding, stringent vaskebuffer og universalvaskebuffer nå romtemperatur, og roter deretter kort.
- 2 Sett sammen filterplateenheten (heretter kalt **FPU**) i denne rekkefølgen fra topp til bunn: lokk, filterplate, adapterkrage og MIDI-plate.

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

**MERK**

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

**FORSIKTIG**

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

Prosedyre

- 1 Fjern **HYB**-platen fra varmeblokken og sentrifuger ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 2 Overfør hele volumet (omtrent 55 µl) for hver prøve til de tilsvarende brønnene på filterplaten.
- 3 Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 5 minutter.
- 4 Vask filterplaten slik:
 - a Tilsett 45 µl stringent vaskebuffer i hver prøvebrønn.
 - b Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 5 minutter.
- 5 Gjenta vaskingen som beskrevet i tidligere trinn.

**MERK**

Hvis vaskebufferen ikke dreneres helt, sentrifuger på nytt ved 2400 × g ved 20 °C til all væsken har gått gjennom (ytterligere 5–10 minutter).

- 6 Kasser alt som flyter gjennom (som inneholder formamid), og monter deretter **FPU** på nytt.
- 7 Tilsett 45 µl universalvaskebuffer i hver prøvebrønn.
- 8 Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 10 minutter.

**MERK**

Påse at all væske er drenert etter sentrifugering. Gjenta sentrifugeringen hvis dette er nødvendig.

Ekstensjonsligasjon av bundne oligonukleotider**Prosedyre**

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

PCR-forsterkning**Tilberedelse**

- 1 Tilbered ny 0,05 N NaOH.
- 2 Bestem hvilke indeksprimere som skal brukes i henhold til plategrafikkutskriften fra Illumina Worklist Manager eller Local Run Manager.
- 3 La PCR-hovedblandingen og de aktuelle indeksprimerne nå romtemperatur. Roter hvert tint rør for å blande og gjør deretter en rask sentrifugering av rørene.
- 4 Sett ut en ny 96-brønners PCR-plate (heretter kalt **AMP**-platen).
- 5 Tilsett indeksprimere i AMP-platen slik:
 - a Tilsett 4 µl av de valgte indeksprimerne [A (A501) – H (A508)] til den aktuelle brønnen i en kolonne på **AMP**-platen.
 - b Kasser de opprinnelige hvite hettene og sett på nye hvite hetter.

- c Tilsett 4 µl av de valgte indeksprimerne [1 (A701) – 12 (A712)] til den aktuelle raden på **AMP**-platen. *Spissene skal byttes etter hver rad for å unngå indeks-krysskontaminasjon.*
 - d Kasser de opprinnelige oransje hettene, og sett på nye oransje hetter.
- 6 Klargjør PCR-hovedblandingen/PCR-polymerase PCR-arbeidsløsningen på følgende måte:
- a Sentrifuger PCR-polymeraserøret et øyeblikk før bruk for å fjerne luftbobler.
 - b For 96 prøver tilsettes 56 µl PCR-polymerase til 2,8 ml PCR-hovedblanding.
 - c Snu den tilberedte PCR-arbeidsoppløsningen 20 ganger for å blande.
- PCR-arbeidsoppløsningen er stabil i romtemperatur i 10 minutter.

Prosedyre

- 1 Ta **FPU** ut av inkubatoren, og fjern deretter aluminiumsfolieforseglingen.
- 2 Dekk til filterplaten med lokket og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 2 minutter.
- 3 Tilsett 25 µl av 0,05 N NaOH i hver prøvebrønn på filterplaten. Pipetter NaOH opp og ned 5–6 ganger.
- 4 Dekk til og inkuber filterplaten ved romtemperatur i 5 minutter.
- 5 Mens filterplaten inkuberes, overføres 22 µl PCR-arbeidsoppløsning i hver brønn på AMP-platen som inneholder indeksprimere.
- 6 Overfør prøver som er eluert fra filteret til AMP-platen slik:
 - a Pipetter prøvene i første kolonne på filterplaten opp og ned 5–6 ganger.
 - b Overfør 20 µl fra filterplaten til tilsvarende kolonne på **AMP**-platen.
 - c Pipetter forsiktig opp og ned 5–6 ganger for å grundig kombinere DNA med PCR-arbeidsoppløsningen.
 - d Overfør gjenværende kolonner fra filterplaten til AMP-platen på samme måte. *Spissene skal byttes etter hver kolonne for å unngå krysskontaminasjon av indeks og prøver.*
- 7 Forsegle **AMP**-platen, og fest den med en gummivalse.
- 8 Sentrifuger ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 9 Overfør **AMP**-platen til postforsterkningsområdet.
- 10 Utfør PCR med følgende program på en termosyklus:
 - 95 °C i 3 minutter
 - 25 sykluser på:
 - 95 °C i 30 sekunder
 - 62 °C i 30 sekunder
 - 72 °C i 60 sekunder
 - 72 °C i 5 minutter
 - Holdes på 10 °C



SIKKERT STOPPEPUNKT

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

PCR-rengjøring

Tilberedelse

- 1 La PCR-rengjøringskulene nå romtemperatur.
- 2 Tilbered ny 80 % etanol fra absolutt etanol.

Prosedyre

- 1 Sentrifuger AMP-platen ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 2 Sett ut en ny MIDI-plate (heretter kalt **CLP**-platen).
- 3 Snu PCR-rengjøringskulene ti ganger. Roter kraftig og snu deretter ytterligere 10 ganger. Kontroller visuelt oppløsningen for å sikre at kulene er resuspendert.
- 4 Tilsett 45 µl PCR-rengjøringskuler i hver brønn i **CLP**-platen.
- 5 Overfør hele PCR-produktet fra AMP-platen til **CLP**-platen.

- 6 Forsegle **CLP**-platen, og rist den på en mikroplateryster ved 1800 o/min i 2 minutter.
- 7 Inkuberes i romtemperatur uten risting i 10 minutter.
- 8 Sett platen på et magnetstativ i minst 2 minutter eller til supernatanten er klar.
- 9 Mens **CLP**-platen står på magnetstativet, fjernes supernatanten forsiktig og kastes.
- 10 Mens **CLP**-platen står på magnetstativet, vaskes kulene slik:
 - a Tilsett 200 µl nyttilberedt 80 % etanol i hver prøvebrønn.
 - b Inkuber platen på et magnetstativ i minst 30 sekunder eller til supernatanten er klar.
 - c Fjern supernatanten forsiktig, og kasser den.
- 11 Gjenta vaskingen som beskrevet i tidligere trinn.
- 12 Bruk en P20 flerkanalsdråpeteller satt på 20 µl til å fjerne overflødig etanol.
- 13 Ta **CLP**-platen ut av magnetstativet, og lufttørk kulene i 10 minutter.
- 14 Tilsett 30 µl elueringsbuffer i hver prøve.
- 15 Forsegle **CLP**-platen, og rist den på en mikroplateryster ved 1800 o/min i 2 minutter. Etter risting må du kontrollere at prøvene ble resuspendert. Hvis ikke skal dette trinnet gjentas.
- 16 Inkuberes i romtemperatur i 2 minutter.
- 17 Sett **CLP**-platen på et magnetstativ i minst 2 minutter eller til supernatanten er klar.
- 18 Sett ut en ny MIDI-plate (heretter kalt **LNP**-platen).
- 19 Overfør 20 µl av supernatanten fra **CLP**-platen til **LNP**-platen.
- 20 **[Valgfritt]** Overfør gjenværende 10 µl av supernatanten fra **CLP**-platen til en ny plate, og merk platen med et kjøringsnavn og dato. Oppbevar denne platen ved -25 °C til -15 °C til sekvenseringskjøringen og dataanalysen er ferdig. De rengjorte PCR-produktene kan brukes til feilsøking hvis det oppstår prøvfeil.



SIKKERT STOPPEPUNKT

Hvis den stopper på dette punktet, forsegles **LNP**-platen og sentrifugeres ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt. Platen er stabil i opp til 3 timer ved 2 °C til 8 °C.

Biblioteknormalisering og -sammenslåing

Tilberedelse

- 1 Klargjør ny 0,1 N NaOH ved å tilsette 30 µl 10 N NaOH til 2970 µl RNase/DNase-fritt vann.
- 2 La biblioteknormaliseringsfortynning, bibliotekkuler, vaskeløsning for biblioteknormalisering og bibliotekfortynningsbuffer nå romtemperatur.
- 3 Roter biblioteknormaliseringsfortynning kraftig, og kontroller at alt bunnfall er oppløst.
- 4 Roter bibliotekkuler kraftig i 1 minutt med vekselvis vending til kulene er resuspendert og ingen pellet finnes på bunnen av røret når røret er vendt opp ned.

Prosedyre

- 1 Bland biblioteknormaliseringsfortynning og bibliotekkuler i et nytt 15 ml kjegleformet rør på følgende måte:



MERK

Ved behandling av < 24 prøver bruker du et nytt 1,5 ml rør.

- a For 96 prøver tilsettes 4,4 ml biblioteknormaliseringsfortynning.
- b Pipetter bibliotekkuler opp og ned 10 ganger for å resuspendere.



MERK

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

- c For 96 prøver pipetteres 800 µl bibliotekkuler i røret som inneholder biblioteknormaliseringsfortynning.
- d Bland ved å snu røret 15–20 ganger.
- 2 Tilsett 45 µl av den kombinerte arbeidsoppløsningen av biblioteknormaliseringsfortynning/bibliotekkuler i hver brønn i **LNP**-platen som inneholder biblioteker.
- 3 Forsegle **LNP**-platen, og rist den på en mikroplateryster ved 1800 o/min i 30 minutter.

**MERK**

Hvis sekvensering skal utføres samme dag, er det lurt å begynne å tine reagenskassetten nå. Følg instruksjonene for tining av MiSeqDx-reagenskassetten i avsnittet *Klargjøre reagenskassetten* på side 23.

- 4 Sett platen på et magnetstativ i minst 2 minutter eller til supernatanten er klar.
- 5 Mens LNP-platen står på magnetstativet, fjernes supernatanten forsiktig og kastes.
- 6 Fjern LNP-platen fra magnetstativet, og vask kulene med vaskeløsning for biblioteknormalisering på følgende måte:
 - a Tilsett 45 µl vaskeløsning for biblioteknormalisering i hver prøvebrønn.
 - b Forsegle LNP-platen, og rist den på en mikroplateryster ved 1800 o/min i 5 minutter.
 - c Sett platen på magnetstativet i minst 2 minutter eller til supernatanten er klar.
 - d Fjern supernatanten forsiktig, og kasser den.
- 7 Gjenta prosedyren for vaskeløsning for biblioteknormalisering som beskrevet i tidligere trinn.
- 8 Bruk en P20 flerkanalstråpeteller satt til 20 µl til å fjerne overflødig vaskeløsning for biblioteknormalisering.
- 9 Fjern LNP-platen fra magnetstativet, og tilsett 30 µl 0,1 N NaOH i hver brønn.
- 10 Forsegle LNP-platen, og rist den på en mikroplateryster ved 1800 o/min i 5 minutter.
- 11 I løpet av elueringen på 5 minutter settes en ny 96-brønners PCR-plate ut (heretter kalt SGP-platen).
- 12 Tilsett 30 µl biblioteklagringsbuffer til hver brønn som skal brukes i SGP-platen.
- 13 Etter elueringen på 5 minutter, påse at alle prøvene på LNP-platen er fullstendig resuspendert. Hvis prøvene ikke er fullstendig resuspendert, pipetteres disse prøvene forsiktig opp og ned, eller bank platen forsiktig mot benken for å resuspendere kulene og rist deretter i ytterligere 5 minutter.
- 14 Sett LNP-platen på magnetstativet i minst 2 minutter.
- 15 Overfør supernatanten fra LNP-platen til SGP-platen. Pipetter forsiktig opp og ned 5 ganger for å blande.
- 16 Forsegle SGP-platen, og sentrifuger deretter ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 17 Roter bibliotekfortynningsbufferen, og kontroller at alt bunnfall er fullstendig oppløst.
- 18 Sentrifuger et øyeblikk for å samle innhold.
- 19 Sett ut et nytt Eppendorf-rør (heretter kalt PAL-røret [Pooled Amplicon Library (Sammensatt amplikonbibliotek)]).
- 20 Bestem hvilke prøver som skal grupperes for sekvensering. Maksimum 48 prøver kan grupperes for sekvensering.
- 21 Overfør 5 µl av hvert bibliotek som skal sekvenseres fra SGP-platen, kolonne etter kolonne, til en strimmel med åtte PCR-rør.
- 22 Kombiner og overfør innholdet i strimmelen med åtte PCR-rør til PAL-røret. Bland PAL-røret grundig.
- 23 Sett ut 2–3 nye Eppendorf-rør (heretter kalt DAL-rørene [Diluted Amplicon Library (Fortynnet amplikonbibliotek)]).
- 24 Tilsett 585 µl bibliotekfortynningsbuffer i DAL-rørene.
- 25 Overfør 9 µl PAL til hvert DAL-rør som inneholder bibliotekfortynningsbuffer. Pipetter opp og ned 3–5 ganger for å skylle spissen og for å sikre at overføringen er fullstendig.

**SIKKERT STOPPUNKT**

Hvis sekvensering på MiSeqDx ikke skal utføres umiddelbart, kan DAL-rørene oppbevares ved –25 °C til –15 °C i opptil 14 dager.

Biblioteksekvensering

Klargjøre for biblioteksekvensering

- 1 Still inn en varmeblokk som rommer 1,5 ml sentrifugerør, på 96 °C.
- 2 Tilbered et isbad i en isbøtte. Avkjøl bibliotekfortynningsbufferen i isvannet.
- 3 Begynn å tine MiSeqDx-reagenskassetten.

Klargjøre reagenskassetten

- 1 Tin MiSeqDx-reagenskassetten – CF 139-variantanalyse i et vannbad som inneholder tilstrekkelig vann av laboratoriekvalitet til å senke bunnen av reagenskassetten til vannlinjen angitt på reagenskassetten. Ikke la vannet komme høyere enn maksimum vannlinje.
- 2 La reagenskassetten tine i vannbadet med romtemperatur i omtrent 1 time eller til den er opptint.
- 3 Ta kassetten opp av vannbadet, og bank den forsiktig på benken for å fjerne vann fra bunndelen av kassetten. Tørk av bunndelen av kassetten. Påse at det ikke har kommet vann på den øvre delen av reagenskassetten.

Kontrollere reagenskassetten

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



MERK

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

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



MERK

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

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

Denaturere og fortynde PhiX-internkontroll

- 1 Klargjør 0,1 N NaOH ved å kombinere følgende volumer i et kjegleformet rør:

- DNase/RNase-fritt vann (2475 µl)
- Stamløsning 10 N NaOH (25 µl)

- 2 Snu røret flere ganger for å blande.



FORSIKTIG

Det er avgjørende å bruke nyfortynnet NaOH slik at prøver blir fullstendig denaturert for klyngegenerering på MiSeqDx.



MERK

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

- 3 Kombiner følgende volumer for å fortynde PhiX-internkontrollbibliotek til 2 nM:

- 10 nM PhiX-internkontrollbibliotek (2 µl)
- 1X TE-buffer (8 µl)

- 4 Kombiner følgende volumer for å få et PhiX-internkontrollbibliotek på 1 nM:

- 2 nM PhiX-internkontrollbibliotek (10 µl)
- 0,1 N NaOH (10 µl)

- 5 Roter et øyeblikk slik at PhiX-internkontrollbiblioteksløsningen på 1 nM blandes.

- 6 Sentrifuger PhiX-internkontrollen på 1 nM ved 280 × g ved 20 °C i 1 minutt.

- 7 Inkuber i 5 minutter ved romtemperatur for å denaturere PhiX-internkontrollbiblioteksløsningen til enkle strenger.

- 8 Kombiner følgende volumer i et nytt mikrosentrifugerør for å få et PhiX-internkontrollbibliotek på 20 pM:

- Denaturert PhiX-internkontrollbibliotek (2 µl)
- Forhåndskjølt bibliotekfortynningsbuffer (98 µl)

**MERK**

Det denaturerte PhiX-internkontrollbiblioteket på 20 pM kan oppbevares i opptil 3 uker ved $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ som alikvoter for engangsbruk.

Klargjøre prøver for sekvensering

- 1 Fortsett med ett **DAL**-rør for sekvensering.
- 2 Hvis **DAL**-røret ble oppbevart i frosset tilstand, skal det tines helt opp og blandes ved å pipettere opp og ned.
- 3 Tilsett 6 μl av 20 pM PhiX-internkontroll i **DAL**-røret.
- 4 Pipetter opp og ned 3–5 ganger for å skylle spissen og sikre at overføringen er fullstendig.
- 5 Bland **DAL**-røret ved å rotere røret ved topphastighet.
- 6 Sentrifuger **DAL**-røret ved $1000 \times g$ ved $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 1 minutt.
- 7 Inkuber **DAL**-røret på en varmeblokk ved $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 2 minutter.
- 8 Etter inkubasjonen inverteres **DAL**-røret 1–2 ganger for blanding før det settes umiddelbart i isvann.
- 9 La **DAL**-røret stå i isvann i 5 minutter.

**MERK**

Utfør varmedenatureringstrinnet umiddelbart før innlasting av **DAL**-røret i MiSeqDx-reagenskassetten for å sikre effektiv malinnsetting på MiSeqDx-strømningscellen.

Laste inn prøvebiblioteker på kassetten

- 1 Bruk en separat, ren og tom 1 ml dråpetellerspiss til å gjennomhulle folieforseglingen over reservoaret på reagenskassetten merket **Load Samples** (Last inn prøver).
- 2 Pipetter 600 μl av **DAL** -prøvebibliotekene i beholderen merket **Load Samples** (Last inn prøver). Unngå å ta på folieforseglingen.
- 3 Sjekk for luftbobler i reservoaret etter at prøven er lastet inn. Hvis luftbobler er tilstede, banker du kassetten forsiktig mot benken for å frigjøre boblene.
- 4 Gå direkte til kjøringsoppsett-trinnene ved hjelp av MiSeq Operating Software (MOS)-grensesnittet.

Tolking av resultater

- 1 Illumina MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalysen er utformet for å detektere 139 CFTR-varianter, inkludert de som anbefales av ACMG (Tabell 2).
- 2 Analyserapporten har oppført prøvenavn og genotype for hver variant som er detektert for en prøve.
 - Alle prøver blir behandlet for 134 CF-fremkallende varianter og R117H-varianten som er anbefalt av ACMG. Bare detekterte mutantalleler er oppført i analyserapporten.
 - PolyTG/PolyT-varianten blir bare rapportert hvis R117H-variasjonen er identifisert for en prøve. For pasienter med en R117H-variant bør det utføres ytterligere testing for å bestemme en PolyTG/PolyT-variant som kan påvirke den kliniske fenotypen [det vil si 12-13 (TG) eller 5T] er i cis/trans-orientering i forhold til R117H-varianten.

**MERK**

PolyTG/PolyT-genotypen bestemmes av MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalysen basert på avlesingstilling av de vanligste genotypene. På grunn av det digitale innholdet av neste generasjon sekvensering, kan analysen oppnå høy nøyaktighet fra flere observasjoner sammenlignet med andre sekvenseringsbaserte teknologier som bruker bare noen få observasjoner.

- Når en prøve har homozygot F508del eller I507del genotype og hvis én eller flere blant de tre godartede polymorfismene I506V, I507V og F508C blir oppdaget, blir dette rapportert for prøven. Hvis alle tre godartede polymorfismene er av villtypen, angir rapporten at I506V-, I507V- og F508C-variantene ikke er tilstede i prøven.

**MERK**

Siden dette er en sekvenseringsbasert analyse, er det ingen interferens med F508del- eller I507del-rapporteringen på grunn av de tre godartede polymorfismene. Det gjøres derfor ingen korreksjoner for å detektere resultatene.

- Genotyperesultatet blir rapportert som HET når en prøve blir identifisert som heterozygot og både villtype og mutantalleler er detektert for prøven.
 - Genotyperesultatet blir rapportert som HOM når en prøve blir identifisert som homozygot og kun mutantallelen er detektert for prøven.
 - Hvis ingen variant blir identifisert for en prøve, angir rapporten «No panel variants are detected» (Ingen panelvarianter er detektert).
- 3 Analyserapporten gir informasjon om prøvepåvisningsfrekvensen for hver prøve. Påvisningsfrekvensen beregnes som antallet variantposisjoner/regioner som oppfyller en forhåndsdefinert konfidensverditerskel, dividert med de totale posisjonene/regionene som behandles.
- For prøver som krever betinget rapportering, er de ekstra variantene som behandles også redegjort for i påvisningsfrekvensberegningen.
 - En variant med en forhåndsdefinert konfidensverdi under terskelverdien blir rapportert som en «No call» (Ingen påvisning). Det anbefales å gjenta prøven.
- 4 Et prøveresultat betraktes kun som gyldig hvis påvisningsfrekvensen er $\geq 99\%$. Hvis påvisningsfrekvensen er under 99% , blir ytelsen rapportert som «Fail» (Mislykket) og prøven må gjentas. Hvis prøvepåvisningsfrekvensen er $< 50\%$, blir ytelsen rapportert som «Fail» (Mislykket) og en kommentar om «Sample Failed» (Prøven mislyktes) angis på rapporten. Det vises ingen variantinformasjon. Prøven må gjentas.
- 5 Det anbefales at variantene som ble validert med syntetiske prøver (se nøyaktighetstabellen), blir verifisert av brukeren med en validert referansem metode før det første pasientresultatet blir rapportert med disse variantene.
- 6 Hvis mer enn to varianter blir identifisert for en prøve, anbefales det at brukeren verifiserer resultatet ved å gjenta prøven med Illumina MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalysen med et nytt gDNA-ekstrakt for å utelukke krysskontaminasjon av prøven.

**MERK**

Haplotype-fasing bør vurderes når to eller flere varianter detekteres.

- 7 Alle varianttolkningene skal utføres av en sertifisert klinisk molekylærgenetiker eller tilsvarende som følger lokale prosedyrer og retningslinjer¹⁵. Potensielle referanser for tolkning omfatter, men er ikke begrenset til: CFTR2-database¹¹, Sosnay-avhandling¹³, ACMG-retningslinjer fra 2004¹ og ACOG-utvalgsuttalelse fra 2011². Du finner informasjon om hvordan resultater beregnes og fremlegges, samt en beskrivelse av innholdet i tekstfilrapport, i veiledningene for analyseprogramvaren som er installert med MiSeqDx. Du finner informasjon om MiSeq Reporter i *Referanseveiledning for MiSeq Reporter-programvaren (dokumentnr. 15038356)*. Du finner informasjon om Local Run Manager i *Referanseveiledning for Local Run Manager-programvaren for MiSeqDx (dokumentnr. 1000000011880)* og *Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager CF 139-variantanalysemodulen (dokumentnr. 1000000012184)*.

Kvalitetskontrollprosedyrer

God laboratoriepraksis dikterer at kontrollmateriale skal evalueres for å detektere ulikhet i blodbehandlingen og tekniske prosedyrer i brukerens laboratorium som kan gi signifikant variasjon i resultatene.

- 1 **Positive kontroller** – En positiv DNA-kontrollprøve er påkrevd i hver kjøring. Den positive kontroll-DNA-prøven skal være en godt karakterisert prøve med minst én kjent CFTR-variant¹⁶. Illumina anbefaler bruk av roterende positive kontroller i overensstemmelse med 2008 ACMG tekniske standarder og retningslinjer for CF-mutasjonstesting¹⁷ og 2013 ACMG kliniske laboriestandarder for neste generasjons sekvensering¹⁸. Den positive kontrollprøven må generere den forventede genotypen. Hvis den positive kontrollen genererer en genotype som er forskjellig fra det som forventes, kan det ha oppstått en feil i prøvesporingen eller feil registrering av indekseringsprimere. Hele analysen må gjentas med start fra bibliotekklargjøring.

- 2 **Negativ kontroll (ingen mal / ingen DNA)** – Bruk av en negativ kontroll (ingen mal / ingen DNA) er påkrevd i hver kjøring for å detektere mulige tilfeller med kontaminasjon. Påvisningsfrekvensen for den negative kontrollen bør være mindre enn 10 %. Hvis en negativ kontroll genererer en påvisningsrate > 10 %, kan det ha forekommet en kontaminasjon under analyseprosessen. Analysen anses å være mislykket og hele analysen må gjentas med start fra bibliotekklargjøring.



MERK

Den negative kontrollprøven rapporteres som «Pass» (Bestått) hvis den genererer en påvisningsfrekvens $\leq 10\%$ og «Fail» (Mislykket) hvis påvisningsfrekvensen er $> 10\%$. På samme måte som for prøver, vil en kommentar om «Sample Failed» (Prøven mislyktes) angis på rapporten når påvisningsfrekvensen er $< 50\%$.

- 3 **Villtypekontroll** – Villtype DNA-kontrollprøve anbefales på hver kjøring. Villtypekontrollprøven bør være en godt karakterisert prøve som ikke inneholder CFTR-varianter. Villtypekontrollprøven må generere den forventede genotypen. Hvis villtypekontrollen generer en genotype som er forskjellig fra det som forventes, kan det ha oppstått en feil i prøvesporingen eller feil registrering av indekseringsprimere. Hele analysen må gjentas med start fra bibliotekklargjøring.
- 4 Før dette produktet brukes for første gang i brukerens laboratorium, bør analyseytelsen kontrolleres ved å teste noen positive og negative prøver med kjente ytelseskarakteristikker.
- 5 Alle kvalitetskontrollkrav bør utføres i samsvar med lokale og statlige regler og godkjennelseskrav.

Ytelseskarakteristikk

Nøyaktighet

Nøyaktigheten for Illumina MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalysen ble vurdert ved å evaluere 500 prøver som representerer en lang rekke CFTR-varianter fra fire ulike kilder. Primærkilden for nøyaktighetsdata var en klinisk nøyaktighetsstudie, utført med et panel på 366 prøver. Størparten (n = 355) av prøvene bestod av arkiverte, anonymiserte kliniske gDNA-prøver isolert fra menneskeblod. De gjenværende 11 prøvene ble tatt fra kommersielt tilgjengelige cellelinjeprøver.

Data fra denne studien ble supplert med nøyaktighetsdata fra 68 cellelinjeprøver, evaluert i reproduktibilitetsstudien, 14 kliniske prøver fra den analytiske studien av ekstraksjonsmetodeevaluering og 52 syntetiske plasmidprøver. De syntetiske plasmidene ble konstruert slik at de inkluderer genomisk sammenheng med de sjeldne variantene, og inneholdt fra én til ni varianter innenfor den samme konstruksjonen. De ble linearisert, fortynnet til genomisk DNA-tilsvarende kopinumre, og blandet med humane genomiske DNA-prøver av villtype-genotype på tilsvarende kopinumre for å etterligne en heterozygot prøve.

Genotypingresultatene for 137 SNV/små InDel-steder, inkludert PolyTG/PolyT-regionen, ble sammenlignet med Sanger toveis sekvensanalyse. To validerte PCR-baserte analyser ble brukt som referansem metode for de to store delesjonene i panelet. Hver dupleks-PCR-analyse brukte to primersett for å skjelne mellom villtype, heterozygote og homozygote genotyper. Ett av primersettene var utformet til å flankere delesjonsbrytingspunktene, mens det andre forsterket en intern region i delesjonen. De to produktene ble detektert med størrelsesseparasjon på et agarosegel.

PCR-analysene ble validert med et panel på 28 prøver i alt (22 prøver for hver delesjon) som bestod av en cellelinje og blødderiverte genomiske DNA-prøver og syntetiske plasmider, som omfattet WT-, HET- og HOM-genotyper for hver store delesjon. Det ble bekreftet at PCR-analysene hadde 100 % spesifisitet og reproduktibilitet for alle testede prøver med evaluering av PCR-produkter på et agarosegel. Nøyaktigheten for PCR-analysene ble bekreftet med Sanger-sekvensering og funnet å være 100 % for alle prøver.

Nøyaktigheten ble bestemt for hver genotype med tre statistiske målinger. Positivt samsvar (PA) ble beregnet for hver variantgenotype ved å dele antallet prøver med samsvarende variantpåvisninger med det totale antallet prøver med denne varianten slik den var identifisert med referansem metodene. Negativt samsvar (NA) ble beregnet på tvers av alle villtypeposisjoner (WT) ved å dele antall samsvarende WT-posisjoner med det totale antallet WT-posisjoner som definert av referansem metodene. Generelt samsvar (OA) ble beregnet på tvers av alle rapporterte posisjoner ved å dele antallet samsvarende WT- og variantposisjoner med det totale antallet rapporterte posisjoner som bestemt av referansem metodene.

Illumina MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalysen hadde et genotype-nivå PA på 100 %. Negativt samsvar for alle WT-posisjoner var > 99,99 % og generelt samsvar for alle rapporterte posisjoner var > 99,99 %. Alle testresultater er basert på innledende testing.

Tabell 16 Generell nøyaktighet for MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse

Variant (vanlig navn)	Varianttype	cDNA-navn	Totale påvisninger per variant	Positive påvisninger (varianter)			Negative påvisninger (villtype)	Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver						
CFTR dele2, 3	DEL	c.54-5940_273+10250 del21kb	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
E60X	SNV	c.178G>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
P67L	SNV	c.200C>T	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R75X	SNV	c.223C>T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G85E	SNV	c.254G>A	500	6	2	0	492	0	0	100	100	100
394delTT	DIV	c.262_263 delTT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
406-1G>A	SNV	c.274-1G>A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
E92X	SNV	c.274G>T	500	0	1	1	498	0	0	100	100	100
D110H	SNV	c.328G>C	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R117C	SNV	c.349C>T	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
R117H	SNV	c.350G>A	500	17	2	0	481	0	0	100	100	100
Y122X	SNV	c.366T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
621+1G>T	SNV	c.489+1G>T	500	7	5	0	488	0	0	100	100	100
663delT	DIV	c.531delT	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
G178R	SNV	c.532G>A	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100

Variant (vanlig navn)	Varianttype	cDNA-navn	Totale påvisninger per variant	Positive påvisninger (varianter)			Negative påvisninger (villtype)	Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver						
711+1G>T	SNV	c.579+1G>T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
P205S*	SNV	c.613C>T	500	1	0	1	498	0	0	100*	100	100
L206W	SNV	c.617T>G	500	8	1	0	491	0	0	100	100	100
1078delT	DIV	c.948delT	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
G330X	SNV	c.988G>T	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R334W	SNV	c.1000C>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
I336K	SNV	c.1007T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
1154insTC	DIV	c.1022_1023 insTC	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R347H	SNV	c.1040G>A	500	6	1	1	492	0	0	100	100	100
R347P	SNV	c.1040G>C	500	3	2	0	495	0	0	100	100	100
R352Q	SNV	c.1055G>A	500	5	0	0	495	0	0	100	100	100
A455E	SNV	c.1364C>A	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
S466X (C>G)	SNV	c.1397C>G	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
1548delIG	DIV	c.1418delIG	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
Q493X	SNV	c.1477C>T	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
I507del	DIV	c.1519_1521 delATC	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100

Variant (vanlig navn)	Varianttype	cDNA-navn	Totale påvisninger per variant	Positive påvisninger (varianter)			Negative påvisninger (villtype)	Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver						
F508del	DIV	c.1521_1523 delCTT	500	84	29	0	387	0	0	100	100	100
1677delTA	DIV	c.1545_1546 delTA	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
V520F	SNV	c.1558G>T	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
1717-1G>A	SNV	c.1585-1G>A	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
G542X	SNV	c.1624G>T	500	12	3	0	485	0	0	100	100	100
S549N	SNV	c.1646G>A	500	2	2	1	495	0	0	100	100	100
S549R (c.1647T>G)	SNV	c.1647T>G	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G551D	SNV	c.1652G>A	500	8	3	0	489	0	0	100	100	100
R553X	SNV	c.1657C>T	500	8	2	0	490	0	0	100	100	100
A559T	SNV	c.1675G>A	500	4	0	1	495	0	0	100	100	100
R560T	SNV	c.1679G>C	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
1812-1 G>A	SNV	c.1680-1G>A	500	0	2	0	498	0	0	100	100	100
1898+1G>A	SNV	c.1766+1G>A	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100
2143delT	DIV	c.2012delT	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100

Variant (vanlig navn)	Varianttype	cDNA-navn	Totale påvisninger per variant	Positive påvisninger (varianter)			Negative påvisninger (villtype)	Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
				Kliniske prøver	Cellelinje-prøver	Syntetiske prøver						
2183AA>G	DIV	c.2051_2052delAAinsG	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
2184insA	DIV	c.2052_2053insA	500	3	0	1	496	0	0	100	100	100
2184delA	DIV	c.2052delA	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R709X	SNV	c.2125C>T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
K710X	SNV	c.2128A>T	500	3	0	0	497	0	0	100	100	100
2307insA	DIV	c.2175_2176insA	500	3	0	2	495	0	0	100	100	100
R764X	SNV	c.2290C>T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
W846X	SNV	c.2537G>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
2789+5G>A	SNV	c.2657+5G>A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
Q890X	SNV	c.2668C>T	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3120G>A	SNV	c.2988G>A	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3120+1G>A	SNV	c.2988+1G>A	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100
3272-26A>G	SNV	c.3140-26A>G	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R1066C	SNV	c.3196C>T	500	6	0	0	494	0	0	100	100	100

Variant (vanlig navn)	Varianttype	cDNA-navn	Totale påvisninger per variant	Positive påvisninger (varianter)			Negative påvisninger (villtype)	Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver						
R1066H	SNV	c.3197G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
W1089X	SNV	c.3266G>A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
Y1092X (C>A)	SNV	c.3276C>A	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
M1101K	SNV	c.3302T>A	500	2	2	0	496	0	0	100	100	100
R1158X	SNV	c.3472C>T	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100
R1162X	SNV	c.3484C>T	500	5	1	0	494	0	0	100	100	100
3659delC	DIV	c.3528delC	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
S1196X	SNV	c.3587C>G	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3791delC	DIV	c.3659delC	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
3849+10kbC>T	SNV	c.3717+12191C>T	500	11	2	0	487	0	0	100	100	100
3876delA	DIV	c.3744delA	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
S1251N	SNV	c.3752G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
3905insT	DIV	c.3773_3774insT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
W1282X	SNV	c.3846G>A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
N1303K	SNV	c.3909C>G	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100

Variant (vanlig navn)	Varianttype	cDNA-navn	Totale påvisninger per variant	Positive påvisninger (varianter)			Negative påvisninger (villtype)	Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver						
CFTR dele22,23 ^s	DEL	c.3964-78_4242+577del	500	1	0	1	498	1 ^s	0	100	99,80	99,80
M1V	SNV	c.1A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q39X	SNV	c.115C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
405+1 G>A	SNV	c.273+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E92K	SNV	c.274G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q98X	SNV	c.292C>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
457TAT>G	DIV	c.325_327 delTATinsG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
574delA	DIV	c.442delA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
711+3A>G	SNV	c.579+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
711+5 G>A	SNV	c.579+5G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
712-1 G>T	SNV	c.580-1G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
H199Y	SNV	c.595C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q220X	SNV	c.658C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
852del122	DIV	c.720741 delAGGG AGAAT GATGAT GAAGTAC	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variant (vanlig navn)	Varianttype	cDNA-navn	Totale påvisninger per variant	Positive påvisninger (varianter)			Negative påvisninger (villtype)	Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver						
T338I	SNV	c.1013C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S341P	SNV	c.1021T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1213delT	DIV	c.1081delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1248+1G>A	SNV	c.1116+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1259insA	DIV	c.1127_128insA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
W401X (c.1202G>A)	SNV	c.1202G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W401X (c.1203G>A)	SNV	c.1203G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1341+1G>A	SNV	c.1209+1G>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
1461ins4	DIV	c.1329_1330insAGAT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1525-1G>A	SNV	c.1393-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S466X (C>A)	SNV	c.1397C>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L467P	SNV	c.1400T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S489X	SNV	1466C>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
S492F	SNV	c.1475C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variant (vanlig navn)	Varianttype	cDNA-navn	Totale påvisninger per variant	Positive påvisninger (varianter)			Negative påvisninger (villtype)	Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
				Kliniske prøver	Cellelinje-prøver	Syntetiske prøver						
Q525X	SNV	c.1573C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1717-8G>A	SNV	c.1585-8G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S549R (c.1645A>C)	SNV	c.1645A>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q552X	SNV	c.1654C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R560K	SNV	c.1679G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1811+1.6kb A>G	SNV	c.1679+1.6 kbA>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E585X	SNV	c.1753G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1898+3A>G	SNV	c.1766+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L732X	SNV	c.2195T>G	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2347delG	DIV	c.2215delG	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2585delT	DIV	c.2453delT	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E822X	SNV	c.2464G>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2622+1G>A [¶]	SNV	c.2490+1G>T [¶]	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E831X	SNV	c.2491G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R851X	SNV	c.2551C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
2711delT	DIV	c.2583delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variant (vanlig navn)	Varianttype	cDNA-navn	Totale påvisninger per variant	Positive påvisninger (varianter)			Negative påvisninger (villtype)	Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
				Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver						
L927P	SNV	c.2780T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S945L	SNV	c.2834C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3007delG	DIV	c.2875delG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G970R	SNV	c.2908G>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3121-1G>A	SNV	c.2989-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1065P	SNV	c.3194T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1077P^	SNV	c.3230T>C	500	0	0	1	499	0^	0	100	100	100
Y1092X(C>G)	SNV	c.3276C>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E1104X	SNV	c.3310G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W1204X (c.3611G>A)	SNV	c.3611G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W1204X (c.3612G>A)	SNV	c.3612G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G1244E	SNV	c.3731G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4005+1G>A	SNV	c.3873+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4016insT	DIV	c.3884_3885insT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q1313X	SNV	c.3937C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variant (vanlig navn)	Varianttype	cDNA-navn	Totale påvisninger per variant	Positive påvisninger (varianter)			Negative påvisninger (villtype)	Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
				Kliniske prøver	Cellelinje-prøver	Syntetiske prøver						
4209TG TT>AA	DIV	c.4077_4080delT GTTinsAA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4382delA	DIV	c.4251delA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
PolyTG/ PolyT [€]	PolyTGPolyT	c.1210-12T[5_9]	19	17	2	0	0	0	0	100	N/A	100
I506V [§]	SNV	c.1516A>G	1	0	0	0	1	0	0	N/A	100	100
I507V [§]	SNV	c.1519A>G	1	0	0	0	1	0	0	N/A	100	100
F508C [§]	SNV	c.1523T>G	1	0	0	0	1	0	0	N/A	100	100
Total			67522	557			66965	1	0	100	> 99,99	> 99,99

DIV er et akronym for Deletion/Insertion Variant (Sletting/Innsetting-variant).

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

§ En syntetisk prøve som var heterozygot for ekson 8 var rapportert som heterozygot for varianten CFTR dele22, 23. Ytterligere undersøkelse viste at dette resultatet sannsynligvis var forårsaket av lavnivå kontaminasjon.

^ Den opprinnelige syntetiske heterozygote prøven ble påvist å være feil klargjort. Da den igjen ble testet etter ny klargjøring med samme plasmid, ble den detektert.

€ Når R117H er positiv, blir PolyTG/PolyT-varianten også rapportert.

§ I tilfeller med én homozygot F508del-variant ble ytterligere tre villtypebaser (dvs. variantene I506V, I507V, F508C) som ikke var identifisert i prøven, også rapportert.

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

Tabell 17 Nøyaktighet for MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse for I506V, I507V og F508C.

Variant (vanlig navn)	Totale påvisninger per variant	Positive påvisninger (varianter)			Negative påvisninger (villtype)	Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
		Kliniske prøver	Cellelinjeprøver	Syntetiske prøver						
I506V	500	7	0	0	493	0	0	100	100	100
I507V	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
F508C	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100

Tabell 18 Nøyaktighet for MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse for PolyTG/PolyT-varianter

PolyTGPolyT genotype	Antall kliniske prøver	Antall cellelinjeprøver	Antall syntetiske prøver	Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger*	% Nøyaktighet
(TG)9(T)7/(TG)11(T)7	2	0	0	0	1	50
(TG)9(T)9/(TG)10(T)7	1	0	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)9	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	25	8	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	10	1	0	0	1	90,9
(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	7	6	0	0	0	100

PolyTGPolyT genotype	Antall kliniske prøver	Antall cellelinjeprøver	Antall syntetiske prøver	Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger*	% Nøyaktighet
(TG)10(T)9/(TG)11(T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)7	13	0	0	0	1	92,3
(TG)11(T)5/(TG)11(T)7	6	0	0	1	0	83,3
(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	52	8	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9^	2	1	0	3^	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
Total**	448			4	3	98,44

* Prøver ble ikke testet på nytt.

^ Ett av de uoverensstemmende resultatene var fra reproduktibilitetsstudien. PolyTG/Poly T-resultatene for prøven var overensstemmende over alle 18 replikatene, men uoverensstemmende med Sanger-toveissekvensering.

** Det totale prøvetallet for PolyTG/PolyT-varianten er 448 fordi alle syntetiske prøver (n = 52) ble bygget ved å blande lineariserte plasmider med én av to cellelinjeprøver, som var en del av reproduktibilitetsstudien. Fordi rapportering av PolyTG/PolyT-varianten for disse ekstra syntetiske prøvene ville resulterte i at varianten ble overrapportert, ble de syntetiske prøvene ekskludert fra denne analysen.

Reproduserbarhet

Reproduserbarheten til MiSeqDx cystisk fibrose-systemet ble bestemt med en blindet studie utført på tre studiesteder med to operatører på hvert sted. To godt karakteriserte paneler på 46 prøver hver ble testet av hver operatør på hvert sted med totalt 810 påvisninger per sted. Panelene inneholdt en blanding av genomisk DNA fra lymfoblastoide cellelinjer med kjente varianter i *CFTR*-genet, i tillegg til leukocytt-utarmet blod, tilsatt lymfoblastoide cellelinjer med kjente varianter i *CFTR*-genet. Blodprøvene ble gitt for å tilrettelegge inkorporering av ekstraksjonstrinnene som ble brukt til å forberede gDNA som fungerer som primæringang for analysearbeidsflyten.

Prøvegjenomgangsfrekvensen, definert som antallet prøver som går gjennom QC-metrikken på første forsøk, var 99,9 %.

Positivt samsvar på genotypenivået for alle varianter var 99,77 %. Negativt samsvar for alle WT-posisjoner var > 99,88 % og generelt samsvar for alle rapporterte posisjoner var > 99,88 %. Alle testresultater er basert på innledende testing. Ingen repetisjonstesting ble utført for reproduserbarhetsstudien.

Tabell 19 Reproduserbarhet for MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse

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

Panel	Prøve-nummer	Prøvegenotype	Variante-ter	Totale påvisninger per sted	Positive samsvarspåvisninger (varianter)			Negative samsvarspåvisninger (villtype)			Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
A	10**	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C ikke tilstede	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Prøve-nummer	Prøvegenotype	Variante	Totale påvisninger per sted	Positive samsvarspåvisninger (varianter)			Negative samsvarspåvisninger (villtype)			Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Prøve-nummer	Prøvegenotype	Variante	Totale påvisninger per sted	Positive samsvarspåvisninger (varianter)			Negative samsvarspåvisninger (villtype)			Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100

Panel	Prøve-nummer	Prøvegenotype	Variante	Totale påvisninger per sted	Positive samsvarspåvisninger (varianter)			Negative samsvarspåvisninger (villtype)			Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
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	394delITT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	59	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Prøve-nummer	Provegenotype	Variante	Totale påvisninger per sted	Positive samsvarspåvisninger (varianter)			Negative samsvarspåvisninger (villtype)			Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 ^s	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 ^s	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 [^]	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 [^]	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Prøve- nummer	Prøvegenotype	Variante	Totale påvisninger per sted	Positive samsvarspåvisninger (varianter)			Negative samsvarspåvisninger (villtype)			Antall feil påvisninger	Antall ingen påvisninger	Positivt samsvar (%)	Negativt samsvar (%)	Generelt samsvar (%)
					Sted 1	Sted 2	Sted 3	Sted 1	Sted 2	Sted 3					
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 [§]	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 [§]	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
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
Total				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

* Villtypeplasseringen som tilsvarer N1303K-varianten for ett replikat, resulterte i en No Call (Ingen påvisning) på grunn av utilstrekkelig dekning.

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

** Bevis angir at prøvene 9 og 10 sannsynligvis ble byttet om av operatøren før biblioteket var klargjort.

§ Villtypeplasseringen som tilsvarer M1V-varianten for ett replikat av hver av to prøver, resulterte i ingen betegnelse på grunn av utilstrekkelig dekning.

Tabell 20 Tilleggsinformasjon om reproduserbarhetsstudievarianter

Variant (vanlig navn)	Varianttype	CFTR- genregion
PolyTG/PolyT	Sammensatt DIV*	Intron 9
2183AA>G	Sammensatt DIV*	Exon 14
CFTR dele2, 3	DEL	Intron1-Intron3
1154insTC	DIV*	Exon 8
I507del	DIV*	Exon 11
F508del	DIV*	Exon 11
2143delT	DIV*	Exon 14
3659delC	DIV*	Exon 22
3876delA	DIV*	Exon 23
394delTT	DIV i homopolymeregionen*	Exon 3
1078delT	DIV i homopolymeregionen*	Exon 8
2184delA	DIV i homopolymeregionen*	Exon 14
3905insT	DIV i homopolymeregionen*	Exon 23
E60X	SNV	Exon 3
R75X	SNV	Exon 3
G85E	SNV	Exon 3
E92X	SNV	Exon 4
R117H	SNV	Exon 4
Y122X	SNV	Exon 4
621+1G>T	SNV	Intron 4
G178R	SNV	Exon 5
711+1G>T	SNV	Intron 5
L206W	SNV	Exon 6
G330X	SNV	Exon 8
R334W	SNV	Exon 8
I336K	SNV	Exon 8
R347P	SNV	Exon 8
R347H	SNV	Exon 8
A455E	SNV	Exon 10

Variant (vanlig navn)	Varianttype	CFTR- genregion
Q493X	SNV	Exon 11
1717-1G>A	SNV	Intron 11
G542X	SNV	Exon 12
S549N	SNV	Exon 12
S549R (c.1647T>G)	SNV	Exon 12
G551D	SNV	Exon 12
R553X	SNV	Exon 12
R560T	SNV	Exon 12
1812-1 G>A	SNV	Intron 12
1898+1G>A	SNV	Intron 13
W846X	SNV	Exon 15
2789+5G>A	SNV	Intron 16
3120+1G>A	SNV	Intron 18
3272-26A>G	SNV	Intron 19
Y1092X (C>A)	SNV	Exon 20
M1101K	SNV	Exon 20
R1158X	SNV	Exon 22
R1162X	SNV	Exon 22
3849+10kbC>T	SNV	Intron 22
W1282X	SNV	Exon 23
N1303K	SNV	Exon 24

* DIV er et akronym for Deletion/Insertion Variant (Sletting/Innsetting-variant).

DNA-ekstraksjon

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

Ekstraksjonsmetode	Antall prøver som ble testet	Påvisningsfrekvens	Nøyaktighet	Prøvens første gjennomgangshastighet*
Alkoholutfelling	168	100 %	100 %	100 %
Kvartfilter kolonneisolasjon	168	100 %	100 %	100 %
Magnetkuleekstraksjon	168	100 %	100 %	100 %

* Prosentandel prøver med påvisningsfrekvens på ≥ 99 % i første kjøring.

DNA-inngang

DNA-inngangsområdet i Illumina MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalysen ble evaluert ved å utføre en seriell fortynningsstudie med 14 representative DNA-prøver som inneholdt 16 unike CF-varianter. Hver prøve ble testet i duplikat på ni DNA-inngangsnivåer fra 1250 ng til 1 ng (1250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng og 1 ng). For bestemmelse av nøyaktighet, ble prøvegenotyper sammenlignet med toveis Sanger-sekvenseringsdata og delejonene ble sammenlignet med PCR-analyse. 1250 ng og 25 ng ble identifisert som henholdsvis øvre og nedre grense for DNA-inngang ≥ 95 % prøvens første gjennomgangshastighet med ingen uriktige betegnelser (100 % nøyaktighet og betegnelsesfrekvens).

DNA-innganger på 1250 ng, 250 ng og 100 ng ble ytterligere testet med 4 representative DNA-prøver og minst 20 replikater per DNA-inngangsnivå for hver prøve ($n=4 \times 20=80$ prøver), mens den nedre grensen på 25 ng ble testet med 14 prøver, 20 replikater for hver prøve ($n=14 \times 20=280$ prøver). Nøyaktigheten og prøvens første gjennomgangshastighet var 100 % på alle DNA-inndatanivåer.

Resultatene angir at Illumina MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalysen kan brukes i DNA-inngangsområdet fra 1250 ng til 25 ng for å gi nøyaktige resultater.

Forstyrrende stoffer

For å vurdere virkningen av forstyrrende stoffer på Illumina MiSeqDx cystisk fibrose-systemet ble analyseytelsen evaluert i nærvær og fravær av mulige forstyrrende stoffer. Åtte fullblodsprøver ble testet i studien, inkludert tre CF-positive prøver med unike genotyper. Fire endogene forstyrrende stoffer (bilirubin, kolesterol, hemoglobin og triglyserid) ble testet ved å tilsette dem i blodprøver før DNA-ekstraksjonen. Konsentrasjonsgrensene for hvert stoff vises i tabellen nedenfor. I tillegg, for å vurdere interferens som skyldes blodprøvetaking (kort prøvetaking), ble EDTA tilsatt i blodprøver, og for å vurdere forstyrrelser som følge av prøvetilberedning, ble den endelige vaskebufferen fra en isolasjonsmetode med kvartfilterkolonne tilsatt rensed genomisk DNA.

MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalysen oppnådde 100 % betegnelsesfrekvens for alle prøvene som ble testet i tillegg til 100 % reproduserbarhet i genotypetyping mellom prøver i nærvær og fravær av forstyrrende stoffer.

For å vurdere effekten av interferens fra multipleksing-indeksprimer ble det utført en krysskontaminasjonsstudie med to prøver, hver med unike homozygote genotyper i fire ulike genomiske posisjoner, og henholdsvis to indeksprimere. Det ble ikke observert endring i variantbetegnelse ved kontaminasjonsnivåer < 40 %. Prøvegenotypen ble heterozygot når kontaminasjonsnivåene var ≥ 40 %.

Ingen interferens ble observert fra noen av de endogene eller eksogene interferensstoffer.

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

Prøveindeksering

Prøveindeksprimere brukes i analysen for å tildele en unik strekkode til hver prøve-DNA, som gir mulighet til å samle sammen flere prøver i en enkel sekvenseringskjøring. Totalt 96 prøveindekser ble testet med åtte unike DNA-prøver for å verifisere analysens evne til å utføre kontinuerlig genotypingpåvisning for en gitt prøve på tvers av ulike kombinasjoner av indekseringsprimeren. Hver prøve ble testet med 12 ulike indekseringsprimerkombinasjoner. Prøveresultatene ble sammenlignet med toveis Sanger-sekvenseringsdata for alle posisjoner/varianter, unntatt de to store delesjonene, som ble bekreftet med en dupleks PCR-analyse. Reproduerbarheten og nøyaktigheten var 100 % for alle prøve-/indeksprimerkombinasjoner.

Referanser

- 1 Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, et al. (2004) Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genetics in Medicine* 6(5): 387–391.
- 2 Committee on Genetics. (April 2011) The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee Opinion. Update on Carrier Screening for Cystic Fibrosis 486: 1–4.
- 3 Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, Farrell PM. (2002) Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations—Correlation With Incidence Data and Application to Screening. *Human Mutation* 19:575–606.
- 4 Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternan DL, Cheng E, Gibson RL, et al. (2008) Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genetics in Medicine* 10(12):851–868.
- 5 Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternan DL, Cheng E, Cutting GR. CFTR-related disorders. Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington; 2008. Available at www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250. [Online] Updated Feb 19, 2008.
- 6 Katkin JP. (2012) Cystic fibrosis: Clinical manifestations and diagnosis. Tilgjengelig på www.uptodate.com. [Online] December 07, 2012.
- 7 Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, et al. 2008 Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 153(2):S4–S14.
- 8 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2010.
- 9 Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). Tilgjengelig på www.genet.sickkids.on.ca/app. [Online] August 2013.
- 10 Rohlfs EM, Zhou Z, Heim R, Nagan N, Rosenblum L, et al. (2011) Cystic Fibrosis Carrier Testing in an Ethnically Diverse US Population. *Clinical Chemistry*; 57(6): 841–848.
- 11 Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). Tilgjengelig på www.cftr2.org. [Online] August 2013.
- 12 The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) Project. Tilgjengelig på www.nacconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf. [Online] Presented by Garry Cutting on behalf of the CFTR2 Project at the 25th Annual North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC) sponsored by the Cystic Fibrosis Foundation. November 04, 2011. Anaheim, CA.

- 13 Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, et al. (2013) Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nature Genetics* 45 (10): 1160-1167.
- 14 Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. (March/April 2001) Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. *Genetics in Medicine* 3(2): 149-154.
- 15 Castellani C, Cuppens H, Macek H Jr, Cassiman JJ, Kerem E, et al. (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cystic Fibrosis* 7:179-196.
- 16 Pratt VM, Caggana M, Bridges C, Buller AM, DiAntonio L, et al. (May 2009) Development of Genomic Reference Materials for Cystic Fibrosis Genetic Testing. *Journal of Molecular Diagnostics* 11(3): 186-193.
- 17 Amos J, Feldman GL, Grody WW, Monaghan K, Palomaki GE, et al. (2008 Edition, Revised 03/2011) American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Clinical Genetic Laboratories.
- 18 Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine*. *Genetics in Medicine* 15(9): 733-747.

Patenter og varemerker

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

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

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

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

© 2020 Illumina, Inc. Med enerett.

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

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

Kontaktinformasjon



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



Illumina Netherlands B. V.
 Freddy van Riemdsdijkweg 15
 5657 EE Eindhoven
 Nederland

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

Produktmerking

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